



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE
ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR
ACICLOVIR EN PLASMA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ILIANA ÁNGELES HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F. EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	M. en C. Inés Fuentes Noriega
Vocal	M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado
Secretario	M. en C. María de Lourdes Mayet Cruz
1er. Suplente	M. en C. José Manuel Morales Hernández
2o. Suplente	M. en C. Luis Jesús García Aguirre

Tema desarrollado en el Laboratorio de Biofarmacia del Conjunto
"E" de la Facultad de Química de la UNAM.

Asesor: M. en C. María de Lourdes Mayet Cruz



Sustentante: Iliana Ángeles Hernández



Agradecimientos

A la M. en C. María de Lourdes Mayet Cruz por su tiempo, su dirección y su apoyo durante el trabajo de laboratorio, en la revisión y discusión de los resultados y manuscrito final de la tesis.

A la Dra. Helgi Helen Jung Cook por las instalaciones de laboratorio y recursos materiales puestos a mi disposición durante la realización de este trabajo.

A la M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado por el tiempo que dedicó a la revisión de la tesis y por sus comentarios para enriquecer el trabajo escrito.

A la M. en C. Inés Fuentes Noriega por su apoyo moral y sus sugerencias durante el desarrollo experimental de la tesis.

A el M. en C. José Manuel Morales Hernández por su atención y sus conocimientos durante el desarrollo experimental del método analítico.

A la QFB Ernestina Hernández García por la donación del estándar de aciclovir sin el cual hubiera sido imposible realizar este trabajo.

Dedicatoria

A Dios por permitirme terminar esta etapa de mi vida.

A mis padres Filiberto y María Elena por ser un apoyo constante durante toda mi vida, por todo el amor que he recibido de su parte y porque a pesar de todo confiaron en mí.

A Jorge gracias por tu paciencia y tu cariño.

A Marec por todos los años que estuvimos juntos.

A Dulce, Mireya, Juan Carlos, Flavio y Gabriel por todos los buenos y malos momentos que hemos compartido.

A Martha Alicia y Adelina gracias por la amistad que me han brindado.

El tiempo que perdiste con tu rosa es lo que la hace tan importante.

El Principito
Antoine de Saint-Exupéry

Índice

	Página
Lista de Figuras	x
Lista de Tablas	xi
Capítulo I. Introducción y Objetivos	1
Capítulo II. Antecedentes	6
2.1. Biodisponibilidad de los medicamentos	6
2.2. Relación entre la concentración plasmática y el efecto farmacológico	6
2.3. La Biodisponibilidad y la Bioequivalencia	7
2.3.1. Equivalentes farmacéuticos	8
2.3.2. Alternativas farmacéuticos	8
2.3.3. Equivalente químico	9
2.3.4. Equivalentes terapéuticos	9
2.3.5. Producto innovador	9
2.3.6. Producto genérico	9
2.3.7. Biodisponibilidad	9
2.4. Estudios de Bioequivalencia	11
2.5. Aciclovir	16
2.5.1. Propiedades fisicoquímicas	16
2.5.2. Farmacocinética	17
2.5.2.1. Absorción	17
2.5.2.2. Distribución	18

2.5.2.3. Metabolismo	19
2.5.2.4. Eliminación	19
2.5.3. Farmacodinamia	21
2.5.3.1. Mecanismo de acción	22
2.5.3.2. Resistencia	24
2.5.4. Toxicidad	24
2.5.5. Contraindicaciones	25
2.5.6. Precauciones	25
2.5.7. Reacciones secundarias y adversas	26
2.5.8. Interacciones medicamentosas y de otro género	26
2.5.9. Precauciones de uso durante el embarazo y lactancia	27
2.5.10. Precauciones y relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y sobre la fertilidad	28
2.5.11. Dosis y vías de administración	29
2.6. Cuantificación de aciclovir en fluidos biológicos	31
2.7. Validación de Métodos Bioanalíticos	35
2.7.1. Linealidad	35
2.7.2. Precisión	37
2.7.3. Exactitud	38
2.7.4. Recuperación	39
2.7.5. Límite de cuantificación	39
2.7.6. Límite de detección	40

2.7.7. Estabilidad del compuesto por analizar	40
2.7.8. Selectividad	41
Capítulo III. Parte Experimental	42
3.1. Método analítico para cuantificar aciclovir en plasma	42
3.1.1. Estándar de aciclovir	42
3.1.2. Material Biológico	42
3.1.3. Reactivos	42
3.1.4. Equipos	43
3.1.5. Preparación de soluciones	44
3.1.5.1. Solución estándar de aciclovir	44
3.1.5.2. Solución amortiguadora de Fosfato de potasio 0.1 M pH= 3.5	44
3.1.5.3. Fase móvil	44
3.1.6. Curva de calibración de aciclovir en agua desionizada y plasma	45
3.1.7. Puntos controles de aciclovir en plasma	46
3.2. Optimización del método analítico para cuantificar aciclovir en plasma	46
3.2.1. Selección de la longitud de onda máxima de absorción	46
3.2.2. Selección de la columna cromatográfica	47
3.2.3. Optimización de la fase móvil	48
3.2.4. Optimización del método para extraer aciclovir del plasma	49
3.3. Validación del sistema	49

3.3.1. Linealidad y precisión del sistema	49
3.4. Validación del método analítico para la cuantificación de aciclovir en plasma	50
3.4.1. Linealidad del método	50
3.4.2. Precisión del método	51
3.4.2.1. Repetibilidad del método	51
3.4.2.2. Reproducibilidad del método	51
3.4.3. Exactitud del método	52
3.4.4. Recuperación absoluta	52
3.4.5. Límite de cuantificación	53
3.4.6. Límite de detección	53
3.4.7. Estabilidad de la muestra analítica	54
3.4.7.1. Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente	54
3.4.7.2. Estabilidad de la muestra almacenada a -20°C durante 1 mes	54
3.4.8. Selectividad del método	54
Capítulo IV. Resultados y análisis de resultados	56
4.1. Optimización del método analítico para la cuantificación de aciclovir en plasma	56
4.2. Validación del sistema	59
4.2.1. Linealidad y precisión del sistema	60

4.3. Validación del método analítico para la cuantificación del aciclovir en plasma	61
4.3.1. Linealidad del método	61
4.3.2. Precisión del método	63
4.3.2.1. Repetibilidad del método	63
4.3.2.2. Reproducibilidad del método	64
4.3.3. Exactitud del método	66
4.3.4. Recuperación absoluta	67
4.3.5. Límite de cuantificación	68
4.3.6. Límite de detección	69
4.3.7. Estabilidad de la muestra analítica	69
4.3.7.1. Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente durante 24 horas	69
4.3.7.2. Estabilidad de la muestra almacenada durante 1 mes a -20°C	71
4.3.8. Selectividad del método analítico	73
Capítulo V. Conclusiones	78
Capítulo VI. Bibliografía	80
Lista de Figuras	
Figura 1. Estructura química del aciclovir	17
Figura 2. Mecanismo de acción del aciclovir	23

Figura 3.	Diagrama de flujo del proceso de extracción de aciclovir en plasma	58
Figura 4.	Linealidad del sistema	61
Figura 5.	Linealidad del método	63
Figura 6.	Solución conteniendo Aciclovir (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	74
Figura 7.	Muestra blanco de plasma	74
Figura 8.	Plasma adicionado con Aciclovir (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	75
Figura 9.	Plasma adicionado con Cafeína (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	75
Figura 10.	Plasma adicionado con Naproxen Sódico (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	76
Figura 11.	Plasma adicionado con Naproxen Sódico (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	76
Figura 12.	Plasma adicionado con Paracetamol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	77

Lista de Tablas

Tabla 1.	Métodos analíticos por CLAR para cuantificar aciclovir en fluidos biológicos	33
Tabla 2.	Curva patrón de aciclovir en agua desionizada y plasma	45
Tabla 3.	Puntos controles de aciclovir en plasma	46
Tabla 4.	Optimización de la fase móvil	48
Tabla 5.	Optimización de la columna cromatográfica	56
Tabla 6.	Resultados de la optimización de la fase móvil	57
Tabla 7.	Linealidad y precisión del sistema	60
Tabla 8.	Linealidad del método analítico	62

Tabla 9.	Repetibilidad del método analítico para cuantificar aciclovir en plasma	64
Tabla 10.	Reproducibilidad del método analítico para cuantificar aciclovir en plasma	65
Tabla 11.	Exactitud del método analítico	66
Tabla 12.	Porcentaje de recuperación absoluta de aciclovir en plasma	67
Tabla 13.	Límite de cuantificación	68
Tabla 14.	Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente durante 24 horas	70
Tabla 15.	Estabilidad de aciclovir en muestras plasmáticas almacenadas durante 1 mes a -20°C	72
Tabla 16.	Selectividad del método analítico	73

Capítulo I. Introducción y Objetivos

En México, con la modificación a la Ley General de Salud en 1997 se sentaron las bases para que en 1998 el Reglamento de Insumos para la Salud incluyera los requisitos para la incorporación de medicamentos al catálogo de genéricos intercambiables (GI).

La Secretaría de Salud (SS) se ha dado a la tarea impulsar el mercado de medicamentos genéricos intercambiables (GI), los cuales fueron introducidos al país desde 1999, pero a la fecha apenas representan un pequeño porcentaje del total de las ventas de fármacos a escala nacional. En julio del 2002 el Consejo de Salubridad General determinó que las instituciones públicas de salud tienen la obligación de privilegiar la adquisición de GI en sus licitaciones⁽¹⁾.

La cámara de diputados también aprobó modificaciones a la Ley General de Salud para que los registros sanitarios se otorguen únicamente a los medicamentos que hayan demostrado su bioequivalencia con el producto innovador, es decir, que acrediten las pruebas para ingresar al catálogo de GI. La iniciativa, que también plantea que dichos registros se renueven cada cinco años, entrará en vigor una vez que sea aprobada por el Senado de la República⁽¹⁾.

Para que los medicamentos genéricos sean intercambiables, deben cumplir, dependiendo del medicamento, con pruebas de perfil de disolución o

bioequivalencia establecidas por la secretaria de salud. En Mayo de 1999 se dió a conocer la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 que establece los criterios y requisitos a observar en la realización de las pruebas para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos, así como los requisitos a los que se deberán sujetar los establecimientos que lleven a cabo dichas pruebas⁽²⁾.

Para poder comparar un producto genérico con el producto innovador es necesario contar con métodos analíticos lo suficientemente sensibles que nos permitan la cuantificación adecuada de las concentraciones del fármaco en el fluido biológico de nuestro interés (plasma, suero, sangre total, orina, etc.). Actualmente existen diversas técnicas que permiten realizar la mencionada cuantificación de los compuestos en fluidos biológicos, como la cromatografía de líquidos de alta resolución, la cromatografía de líquidos acoplada a espectrofotometría de masas, la cromatografía de gases y el radioinmunoanálisis⁽³⁾.

En general, se prefiere la utilización de los métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución o la cromatografía de gases por su alta selectividad. Estos métodos son capaces de discernir el compuesto de nuestro interés de metabolitos u otras sustancias endógenas⁽³⁾.

Para trabajar muestras de fluidos biológicos es indispensable que estas sufran procesos de semipurificación. Estos procesos tienen el propósito de

eliminar las sustancias que puedan dañar las columnas empleadas para la separación de los compuestos y dejar una matriz biológica lo más pura posible, que permita cuantificar de manera precisa y exacta las concentraciones de las sustancias de interés. Los procesos de semipurificación de las muestras pueden ser tan simples como la precipitación de proteínas hasta procesos más complicados. Las características del proceso de semipurificación dependen de las concentraciones de fármaco que sean necesarias determinar (a mayores concentraciones, menos purificación de la muestra es necesaria) y de las propiedades fisicoquímicas del fármaco a analizar⁽³⁾.

Independientemente de la técnica desarrollada, para que los métodos puedan ser empleados en la determinación de los fármacos, deben cumplir ciertos criterios de validación. Estos criterios se dividen en dos partes: la validación que se realiza durante el montaje del método analítico y aquella que se lleva a cabo como evaluación de la calidad del método durante la determinación de las muestras provenientes de los sujetos que se están estudiando⁽³⁾.

El aciclovir es un análogo sintético del nucleósido guanina utilizado en el tratamiento y profilaxis de infecciones causadas por el virus del herpes simple y varicela Zoster⁽⁴⁾.

El virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2), también conocido como herpes genital es una de las infecciones virales más comunes en los humanos. El HSV-2 afecta a más de 31 millones de personas en Estados Unidos entre los 15 y 74

años de edad, es decir una de cada 5 personas presenta esta enfermedad. Esta cifra tal vez sea mayor en Mexico, ya que la educación sexual en la población es muy pobre.

El primer medicamento de administración sistémica contra el virus herpético fue la vidarabina. Sin embargo, su toxicidad hizo que se empleara únicamente en infecciones causadas por los virus de herpes simple (HSV) y de varicela Zoster (VZV) que podían ser letales. El descubrimiento y obtención de aciclovir, aprobado inicialmente en 1982, sentó las bases para el primer tratamiento eficaz contra infecciones menos graves por HSV y VZV en pacientes ambulatorios. Este compuesto es ampliamente tolerado en diferentes poblaciones y estados de enfermedad y tiene un alto margen terapéutico posiblemente debido a su alta selectividad y actividad biológica⁽⁴⁾.

El aciclovir está incluido en el cuadro básico de medicamentos⁽⁵⁾ y en el catálogo de medicamentos genéricos intercambiables⁽⁶⁾. En el "Acuerdo por el que se relacionan las especialidades Farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables y se determinan las pruebas que deberán aplicárseles"⁽⁷⁾, se especifica que el aciclovir en la presentación de forma sólida, deberá ser sometido a la prueba de intercambiabilidad tipo C o estudio de bioequivalencia.

Considerando lo antes mencionado, se realizó el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- Optimizar un método analítico confiable, rápido, sencillo y selectivo por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de aciclovir en plasma. Se espera que este método pueda ser utilizado para evaluar la bioequivalencia de una forma farmacéutica sólida conteniendo este fármaco.
- Validar el método analítico de acuerdo a las especificaciones establecidas en la NOM-177-SSA1-1998.

Capítulo II. Antecedentes

2.1. Biodisponibilidad de los medicamentos⁽³⁾

Dos formulaciones farmacéuticas pueden contener el mismo principio activo y la misma dosis. Debido a que existen diferencias en los procesos de manufactura, pueden existir diferencias en la cantidad del fármaco absorbido y en la velocidad de absorción del fármaco. Como resultado, las concentraciones plasmáticas del principio activo alcanzadas con una y otra formulación pueden ser diferentes. Las diferencias en las concentraciones plasmáticas se traducen en una intensidad de los efectos, tanto terapéuticos como tóxicos, distinta. Esas diferencias pueden ser de tal magnitud que pongan en peligro la vida de los pacientes. Por lo tanto, para que dos formulaciones sean consideradas intercambiables se debe de verificar que además del mismo principio activo y la misma dosis, tengan la misma biodisponibilidad.

2.2. Relación entre la concentración plasmática y el efecto farmacológico⁽³⁾

En farmacología se considera que el efecto producido por un fármaco se incrementa al aumentar su concentración en su sitio de acción. Sin embargo, por razones prácticas y éticas, no es posible tomar muestras para medir la concentración de un fármaco en su sitio de acción al administrarlo en un ser humano. En términos prácticos, los únicos sitios de donde se pueden tomar varias muestras sin provocar mayor incomodidad al paciente son la sangre o la orina.

Al administrar un fármaco por vía sistémica, este llega a la sangre mediante el proceso llamado absorción. El fármaco se diluye en el plasma y de esta manera puede llegar a todos los tejidos irrigados por la circulación. De esta forma, el fármaco llega tanto a su sitio de acción terapéutica como a otros tejidos donde también puede provocar efectos colaterales. Una vez que se establece el equilibrio entre la concentración del fármaco en el plasma y en su sitio de acción, es posible establecer una relación entre la concentración plasmática y el efecto farmacológico. De esta manera las concentraciones plasmáticas bajas se relacionan con un efecto poco intenso, mientras que las concentraciones plasmáticas elevadas están relacionadas con un efecto de gran intensidad.

Para establecer la relación entre la concentración plasmática y el efecto, se llevan a cabo estudios en los que voluntarios sanos o pacientes reciben un fármaco por vía sistémica. A diversos tiempos se mide la intensidad del efecto farmacológico y se toman simultáneamente muestras de sangre. Se mide la concentración del fármaco en plasma y se relacionan los valores de concentración con los del efecto. Puede también medirse la concentración del fármaco en suero o en sangre total para establecer este tipo de relaciones.

2.3. La Biodisponibilidad y la Bioequivalencia⁽³⁾

La administración de un fármaco a un organismo vivo conlleva a una serie de procesos que son estudiados por la farmacocinética y que son los responsables de la aparición del efecto farmacológico. Estos procesos son la absorción, la

Antecedentes

distribución, el metabolismo o biotransformación y la eliminación de los fármacos. En caso de los medicamentos administrados por vías distintas a las intravasculares, el efecto de un fármaco depende en gran medida de su absorción en el torrente sanguíneo. Existe un término denominado biodisponibilidad (disponibilidad biológica) que se define como la velocidad y la cantidad a la cual el principio activo o entidad terapéutica se absorbe para alcanzar la circulación sistémica y estar disponible para ejercer su efecto. Un estudio de biodisponibilidad comparativa se refiere a la comparación de la biodisponibilidad de diferentes formulaciones de un mismo fármaco. Cuando se dice que dos formulaciones de un mismo fármaco son bioequivalentes, se asume que tendrán el mismo efecto terapéutico o que serán equivalentes terapéuticos. En ese sentido vale la pena mencionar que desde el punto de vista de dos formulaciones farmacéuticas, existen varias definiciones a tomar en cuenta⁽⁸⁾:

2.3.1. Equivalentes farmacéuticos: son aquellas formas farmacéuticas que contienen la misma cantidad de principio activo en la misma dosis y en la misma forma farmacéutica, pero no necesariamente los mismos excipientes.

2.3.2. Alternativas farmacéuticas: son aquellos productos que contienen la misma molécula terapéutica, pero en diferente dosis, diferente forma farmacéutica o diferente sal.

2.3.3. Equivalente químico: son aquellos productos que contienen la misma molécula química.

2.3.4. Equivalentes terapéuticos: productos que presentan la misma eficacia que el producto innovador.

2.3.5. Producto innovador: es aquel producto que tiene la patente en el ámbito mundial y fue registrado con la documentación de su eficacia, seguridad y calidad.

2.3.6. Producto genérico: producto cuya patente ha vencido y que se comercializa con un nombre genérico o con una marca.

2.3.7. Biodisponibilidad: es la medida tanto de la cantidad como de la velocidad con que un fármaco inalterado llega a la circulación general después de la administración del medicamento.

La biodisponibilidad de un fármaco se define tomando en cuenta los siguientes parámetros:

- 1) Concentración plasmática máxima (C_{max}).
- 2) Tiempo al cual se alcanza la concentración máxima de fármaco en plasma (t_{max}).
- 3) Área bajo la curva de la concentración sanguínea o plasmática del fármaco en función del tiempo (ABC).

Antecedentes

Existen dos tipos de Biodisponibilidad: la Biodisponibilidad absoluta que compara una administración intravenosa contra una administración extravascular y se realiza con el objeto de conocer el efecto del primer paso, y la Biodisponibilidad relativa donde se comparan dos productos administrados por vía extravascular.

Finalmente, dos productos son considerados bioequivalentes si son equivalentes farmacéuticos (formas farmacéuticas similares fabricadas por diferentes compañías) o si son alternativas farmacéuticas (diferentes formas farmacéuticas) siempre y cuando su velocidad y cantidad absorbidas no muestren diferencias significativas cuando se administran a la misma dosis de la entidad terapéutica bajo condiciones experimentales similares⁽³⁾.

Un producto podrá ser registrado como genérico intercambiable:

- 1) Si demuestra ser bioequivalente con aquel producto que contiene la misma dosis de principio activo.
- 2) Si la forma farmacéutica es la misma.
- 3) Si el producto de referencia ha sido anteriormente aprobado como innovador y se encuentra vigente en el mercado.

Existen una gran cantidad de factores tanto fisiológicos y fisicoquímicos como de la formulación farmacéutica que influyen de manera importante en la biodisponibilidad de los compuestos. Como actualmente es frecuente encontrar

Antecedentes

varias compañías farmacéuticas fabricantes de medicamentos que contienen el mismo principio activo, es indispensable evaluar si esas formulaciones son bioequivalentes (tienen igual biodisponibilidad). Esto es, deberá evaluarse si las formulaciones de diferentes compañías se absorben con la misma velocidad y en la misma cantidad, de tal modo que produzcan efectos farmacológicos y/o toxicológicos iguales. La razón por la que no puede haber diferencia significativa en la biodisponibilidad es debido a que si un medicamento de prueba alcanza concentraciones circulantes inferiores, se corre el riesgo de no provocar el efecto deseado, y así mismo si alcanza concentraciones mayores se corre el riesgo de que provoque mayores efectos adversos⁽³⁾.

2.4. Estudios de Bioequivalencia⁽³⁾

El propósito de demostrar la bioequivalencia es establecer si al cambiar de marca comercial no será en detrimento del paciente que está sometido a un tratamiento. La equivalencia terapéutica de las marcas comerciales a administrar debe estar garantizada.

En el acuerdo emitido el 19 de marzo de 1998, se determinaron las pruebas a las que deberán someterse los medicamentos susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos intercambiables para acreditar su intercambiabilidad, siendo éstas las de perfil de disolución o bioequivalencia; para determinar el tipo de prueba que corresponde a cada medicamento se tomó en

Antecedentes

cuenta su naturaleza química, forma farmacéutica, uso terapéutico y farmacocinética⁽⁷⁾.

A continuación se reproduce textualmente parte del *"ACUERDO por el que se relacionan las especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables y se determinan las pruebas que deberán aplicárseles"*⁽⁷⁾.

Los criterios que deberán tomarse en cuenta para determinar el tipo de prueba que deberá aplicarse para considerar a un medicamento como genérico intercambiable, son los siguientes:

- I. Los medicamentos que no requieren someterse a pruebas de disolución o bioequivalencia son:
 - a. Las soluciones acuosas para uso parenteral en las que se mantengan las condiciones del medicamento innovador;
 - b. Las soluciones orales exentas de excipientes conocidos que modifiquen los parámetros farmacocinéticos;
 - c. Los gases;
 - d. Los medicamentos tópicos de uso no-sistémico cuya absorción no implique riesgo;
 - e. Los medicamentos para inhalación en solución acuosa, y

- f. Los medicamentos para inhalación en suspensión que demuestren que el tamaño de partícula es equivalente con el innovador.
- II. Todos los medicamentos sólidos orales, con excepción de los que se encuentren en alguno o más de los supuestos señalados en la siguiente fracción, deberán someterse a pruebas de perfil de disolución.
- III. Los medicamentos que deberán someterse a pruebas de bioequivalencia son:
- a. Los medicamentos sólidos orales, con fármacos que requieran para su efecto terapéutico de una concentración estable y precisa, por tener un margen terapéutico estrecho;
 - b. Los medicamentos empleados para enfermedades graves;
 - c. Los medicamentos de los cuales se tenga conocimiento, por reportes previos, que tiene problemas de biodisponibilidad, como es el caso cuando presentan una pobre absorción, un efecto de primer paso acentuado, metabolismo hepático mayor del 70%, eliminación presistémica, ventana de absorción y cinética no lineal;
 - d. Los medicamentos que presentan propiedades fisicoquímicas adversas, como baja solubilidad, inestabilidad y otras similares;
 - e. Los medicamentos que tengan una forma farmacéutica de liberación modificada;

Antecedentes

- f. Los medicamentos que presenten una proporción elevada de excipientes respecto del principio activo;
- g. Los medicamentos que sean de administración tópica para efecto sistémico, como supositorios, parches transdérmicos, geles de aplicación en mucosa y otros similares;
- h. Las combinaciones fijas de principios activos para acción sistémica;
- i. Los medicamentos que sean de administración tópica de efecto no sistémico, cuya absorción sea riesgosa, los cuales deberán demostrar mediante un estudio de biodisponibilidad su no-absorción,
y
- j. Los antibióticos en presentación sólida con vía de administración oral, que previamente a la prueba de bioequivalencia deberán realizar como parte de las pruebas de control de calidad, un estudio de concentración mínima inhibitoria.

Este acuerdo clasifica a los medicamentos susceptibles de incorporarse al catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables de acuerdo a las pruebas que deben cumplir para demostrar su intercambiabilidad como A, B o C.

- A. Corresponde a cumplir lo indicado en el artículo 75 del Reglamento de Insumos para la salud, con excepción de lo señalado en la fracción III.

- B. Corresponde a cumplir lo indicado en el artículo 75 del Reglamento de Insumos para la Salud, y para efectos de la prueba señalada en la fracción III deberá aplicarse la de perfil de disolución.
- C. Corresponde a cumplir lo indicado en el artículo 75 del Reglamento de Insumos para la Salud, y para los efectos de la prueba señalada en la fracción deberá aplicarse la de bioequivalencia.

El artículo 75 del Reglamento de Insumos para la Salud⁽⁹⁾ menciona que se incorporarán al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables únicamente las especialidades farmacéuticas que reúnan los siguientes requisitos:

- I. Que cuenten con registro sanitario vigente;
- II. Que respecto del medicamento innovador o producto de referencia, tengan la misma sustancia activa y forma farmacéutica, con igual concentración o potencia, utilice la misma vía de administración y con especificaciones farmacopeicas iguales o comparables;
- III. Que cumplan con las pruebas determinadas por el Consejo de Salubridad General y la Secretaría;
- IV. Que comprueben que sus perfiles de disolución o su biodisponibilidad u otros parámetros, según sea el caso, son equivalentes a los del medicamento innovador o producto de referencia, y

- V. Que estén incluidos en el Cuadro Básico de Insumos para el primer nivel y en el Catálogo de Insumos para el segundo y tercer nivel.

El Diario Oficial de la Federación, emitido por la Secretaría de Salud con fecha del 18 de agosto de 1998⁽¹⁰⁾, incluye al aciclovir en el Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables y en el Cuadro básico de Insumos.

El Cuadro Básico y Catálogo de medicamentos publicados por el Consejo de Salubridad general, se mantiene permanentemente actualizado, de acuerdo con las necesidades emanadas de los problemas de salud y con el avance en el conocimiento clínico y farmacológico.

2.5. Aciclovir

2.5.1. Propiedades fisicoquímicas ^(11, 12, 13, 14)

Nombre IUPAC: 2-Amino-1,9-dihidro-9-[(2-hidroxietoxi)metil]-6H-purin-6-ona; acicloguanosina; 9-[(2-hidroxietoxi)metil]guanina.

Nombre genérico DCI (Denominación Común Internacional): Aciclovir.

Nombres comerciales: Acifur, Cicloferon, Epsin, Laciken, Opthavir, Zetavir, Ziverone, Zovirax.

Fórmula condensada: $C_8H_{11}N_5O_3$

Peso molecular: 225.21 g/mol.

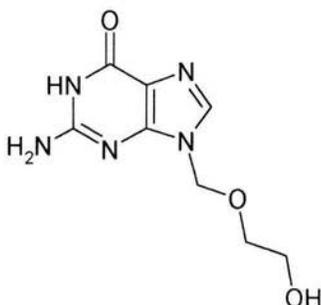


Figura 1. Estructura química del aciclovir

Solubilidad: Ligeramente soluble en agua, prácticamente insoluble en alcohol y en la mayoría de solventes orgánicos. Soluble en soluciones acuosas de hidróxidos de álcalis y ácidos minerales.

pK_a: 9.25

pK_b: 2.27

Punto de fusión: 256.5 – 257 °C

2.5.2. Farmacocinética^(4, 12, 15)

2.5.2.1. Absorción

El aciclovir se absorbe lenta e incompletamente en el tracto gastrointestinal y la absorción no se ve afectada por la ingestión de alimentos. La biodisponibilidad varía del 15 al 30% y disminuye conforme aumenta la dosis.

Después de 1.5 a 2.5 horas se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas de 0.4 a 0.8 µg/mL en promedio luego de consumir dosis de 200 mg, y

Antecedentes

de 1.6 $\mu\text{g/mL}$ después de la ingestión de 800 mg. Después de la administración intravenosa, las concentraciones plasmáticas máxima y mínima son de 9.8 $\mu\text{g/mL}$ y 0.7 $\mu\text{g/mL}$ en promedio luego de aplicar 5 mg/kg de peso durante ocho horas, y 20.7 $\mu\text{g/mL}$ y 2.3 $\mu\text{g/mL}$ después de administrar 10 mg/kg de peso durante el mismo tiempo.

Las concentraciones de aciclovir en el estado estacionario para dosis de 200 y 400 mg son de 0.52 y 1.22 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y estos niveles se alcanzan entre 1 y 2 días.

En la piel intacta la absorción del aciclovir en crema es mínima y no puede ser detectado en sangre ni orina, pero en la piel enferma su absorción es moderada. El ungüento oftálmico se absorbe rápidamente a través del epitelio corneal y de los tejidos oculares superficiales, favoreciendo las concentraciones antivirales en el humor acuoso. Después de la aplicación tópica no ha sido posible detectarlo en sangre por los métodos disponibles y aunque en la orina existen trazas detectables, estos niveles no son terapéuticamente significativos.

2.5.2.2. Distribución

El aciclovir se distribuye ampliamente en los tejidos y líquidos corporales incluyendo cerebro, riñones, hígado, pulmones, humor acuoso, intestinos, músculos, bazo, útero, mucosa vaginal y secreciones vaginales, semen, líquido

Antecedentes

cefalorraquídeo (LCR) y líquido de las vesículas. En comparación con sus cantidades en plasma, las concentraciones en saliva son pequeñas y las que se encuentran en las secreciones vaginales varían ampliamente. El aciclovir se concentra en leche materna, líquido amniótico y placenta. Los valores plasmáticos en neonatos son semejantes a los de la madre.

La unión a proteínas se encuentra en el intervalo de 9 a 33% y el volumen de distribución en el estado estable es de aproximadamente 40 ± 6 litros por 1.73 m^2 .

La farmacocinética del aciclovir se ajusta a un modelo abierto de dos compartimentos.

2.5.2.3. Metabolismo

La biotransformación del aciclovir es por vía hepática. En orina se encuentra de un 9 a un 14% de la dosis en forma del metabolito 9-carboximetoximetilguanina el cual no tiene acción antiviral. La vida media del aciclovir es de 2 a 3 horas.

2.5.2.4. Eliminación

El aciclovir es excretado a través del riñón por filtración glomerular y secreción tubular con 45 a 79% de una dosis intravenosa recobrada sin cambios en orina en aproximadamente seis horas y al término de las 24 horas se ha eliminado más del 95% de la dosis.

La vida media de eliminación es de 2 a 3 horas para adultos con función renal normal y la depuración total es 15.6 L/h/1.73 m².

En neonatos el $t_{1/2}$ es ligeramente más largo (2.5 a 5 horas) mientras que en niños mayores de un año la farmacocinética del aciclovir es generalmente comparable con la de los adultos.

Como el riñón es la principal ruta de eliminación del aciclovir, el daño renal afecta las concentraciones en plasma. En comparación con pacientes que tienen una función renal normal, los pacientes con daño renal severo a los cuales se les ha administrado aciclovir presentan valores de C_{max} del doble, con valores de $t_{1/2}$ 10 veces mayores (de 20 horas aproximadamente) y la depuración total (CL) decrece 10 veces.

La mayor parte de la dosis por infusión intravenosa es excretada inalterada y solamente el 14% aparece en orina en forma del metabolito 9-carboximetoximetilguanina, el cual es inactivo. A la excreción fecal le corresponde cerca del 2% de la dosis y un metabolito menor, la 8-hidroxi-9-[2-(hidroxietoxi)metil]guanina, representa menos del 0.2%.

2.5.3. Farmacodinamia⁽⁴⁾

El aciclovir es un análogo sintético del nucleósido guanina. Es utilizado principalmente para el tratamiento de infecciones virales ocasionadas por el virus del herpes simple (tipo 1 y 2), herpes zoster y varicela.

Las infecciones por herpes simple incluyen el herpes keratitis, herpes labialis, y herpes genital que responden al aciclovir por vía intravenosa, oral o administración tópica. El aciclovir debe suministrarse tan pronto como sea posible después de que los síntomas aparecen. Las infecciones iniciales y recurrentes pueden ser tratadas exitosamente, sin embargo cuando el tratamiento es suspendido, las infecciones pueden recurrir.

El HSV-2 es caracterizado por ciclos de latencia viral y reactivación que permanecen durante el trascurso de la vida de un individuo infectado. Aunque no existe cura para el herpes genital, el aciclovir es el antiviral más utilizado porque ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de HSV-1, HSV-2 y varicela Zoster.

La infección por el virus del herpes simple tipo 1 ocasiona enfermedades en boca, cara, piel, esófago y cerebro. El virus del herpes simple tipo 2 suele causar infecciones en genitales, recto, piel, manos o meninges. En cualquiera de los dos casos, la infección puede ser primaria o surgir un cuadro patológico por activación de una infección latente.

2.5.3.1. Mecanismo de acción⁽⁴⁾

El aciclovir bloquea la síntesis de DNA viral y es transformado en el derivado monofosfato por acción de la timidincinasa del virus herpético. Ocurrido lo anterior, el monofosfato de aciclovir es fosforilado hasta llegar a difosfato y trifosfato por medio de enzimas celulares. Las células sanas convierten poco o nulo fármaco en derivados fosforilados, por tal razón, el aciclovir es activado de manera selectiva en células infectadas por virus herpéticos que codifican timidincinasas apropiadas. Su selectividad de acción depende de su interacción con dos proteínas virales diferentes. La captación celular y la fosforilación inicial son facilitados por la timidincinasa del virus de herpes simple (HSV). La afinidad del aciclovir por la enzima mencionada es aproximadamente 200 veces mayor que su afinidad por la misma enzima en mamíferos. Las enzimas celulares transforman el monofosfato en aciclovirtrifosfato. Esta molécula aparece en concentraciones de 40 a 100 veces mayores en las células infectadas por HSV, que en las no infectadas y establece competencia por el desoxiguanosintrifosfato endógeno (dGTP). El aciclovirtrifosfato bloquea en forma competitiva a las DNA polimerasas virales y en mucho menor extensión a las DNA polimerasas celulares. El aciclovirtrifosfato también es incorporado en el DNA viral, en que actúa como un "terminador de cadena" ya que carece del grupo 3'-hidroxil. Por un mecanismo llamado "inactivación suicida", la plantilla de DNA terminado que contiene el aciclovir se liga a la enzima DNA polimerasa y, en forma irreversible, la inactiva.

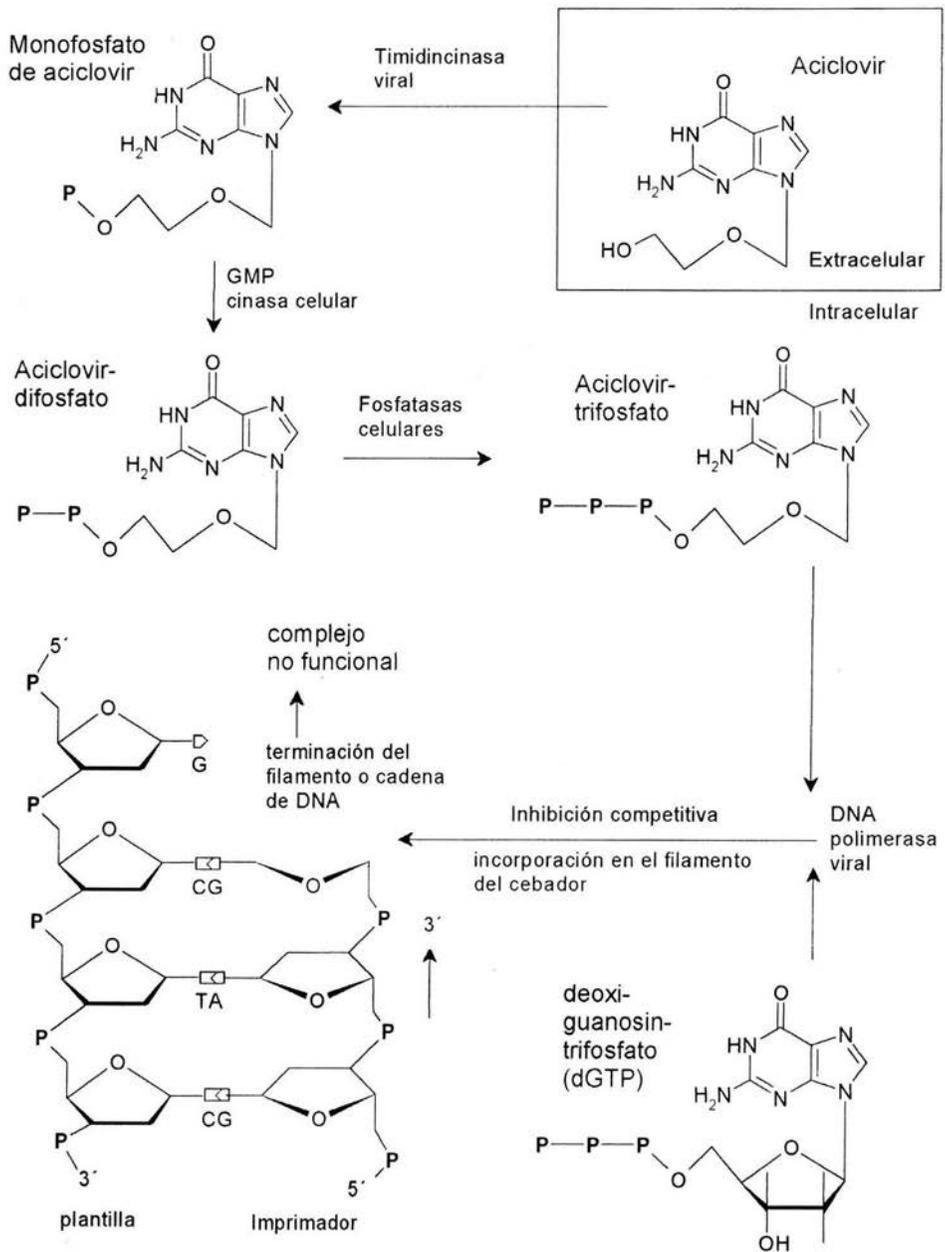


Figura 2. Mecanismo de acción del aciclovir

2.5.3.2. Resistencia⁽⁴⁾

La resistencia del virus de herpes simple al Aciclovir se ha vinculado con alguno de los tres mecanismos siguientes:

- Producción nula o parcial de la timidincinasa viral.
- Alteración de la especificidad del sustrato de la timidincinasa (fosforilación de la timidina, pero no del Aciclovir).
- Alteración de la DNA polimerasa viral.

2.5.4. Toxicidad⁽¹²⁾

La insuficiencia renal y los efectos adversos en el sistema nervioso central limitan la dosis de aciclovir por vía intravenosa. Entre los factores de peligro para que surjan ambos problemas están la insuficiencia renal preexistente, el uso de grandes dosis y los valores altos de aciclovir en plasma (mayores de 25 µg/mL).

Puede presentarse disfunción renal reversible en 5% de los pacientes relacionada con altas concentraciones de fármaco en orina, lo cual genera nefropatía por cristales. Entre las manifestaciones están náusea, emesis, dolor del costado e hiperazoemia creciente. Los factores que agravan dicho peligro incluyen ritmo rápido de goteo intravenoso, deshidratación y diuresis inadecuada.

Por lo general, la nefrotoxicidad se detiene al interrumpir el uso del fármaco. En 1 a 4% de los individuos aparece neurotoxicidad y ésta puede manifestarse por alteraciones de la conciencia, temblor, mioclonía, delirio, convulsiones, signos

Antecedentes

extrapiramidales, o todo este conjunto de manifestaciones. En casos graves, puede ser útil la hemodiálisis. También se ha descrito flebitis después de extravasación de líquido, erupciones, diaforesis, náusea, hipotensión o nefritis intersticial.

2.5.5. Contraindicaciones⁽¹²⁾

Está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad conocida al aciclovir, en sujetos que sufran deshidratación o daño renal preexistente. Este fármaco tampoco puede ser utilizado por personas que presenten alteraciones o reacciones neurológicas conocidas a medicación citotóxica.

El aciclovir en crema está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad conocida al principio activo o al propilenglicol.

2.5.6. Precauciones^(12, 15)

El aciclovir tiene que ser administrado con precaución a pacientes con daño renal y ajustar las dosis de acuerdo a la depuración de creatinina. La administración parenteral debe ser bajo infusión intravenosa en una hora para evitar la precipitación del fármaco en el riñón; el bolo intravenoso debe evitarse y mantenerse una hidratación adecuada. El riesgo de daño renal es incrementado por el uso concomitante de otros fármacos nefrotóxicos.

2.5.7. Reacciones secundarias y adversas^(12, 15)

Se han presentado efectos gastrointestinales como náusea, vómito, diarrea y dolor abdominal; también se han reportado erupciones cutáneas que desaparecen espontáneamente al suspender el medicamento.

Otros efectos reportados ocasionalmente incluyen: ligero aumento pero transitorio de las bilirrubinas y enzimas hepáticas, aumento discreto en la urea y creatinina, así como disminución de los índices hematológicos.

Reacciones neurológicas reversibles como vértigo, estados de confusión, alucinaciones, somnolencia y convulsiones han sido reportadas ocasionalmente, generalmente en pacientes con insuficiencia renal en quienes se utilizaron dosis mayores a las recomendadas o con otros factores predisponentes

Después de la aplicación de aciclovir en crema se puede presentar la sensación de quemaduras o picazón transitorias en algunos sujetos; se ha presentado resequedad ligera de la piel en aproximadamente 5% de los pacientes.

2.5.8. Interacciones medicamentosas y de otro género⁽¹²⁾

Al combinar aciclovir con zidovudina a veces se advierten somnolencia y letargia profundas.

La administración concomitante de ciclosporina y tal vez de otros medicamentos nefrotóxicos, agravan el peligro de nefrotoxicidad.

El probencid disminuye la depuración por riñones y prolonga la vida media plasmática.

El aciclovir puede disminuir la depuración renal de otros fármacos que se eliminan por secreción activa como el metotrexato.

2.5.9. Precauciones de uso durante el embarazo y lactancia⁽¹²⁾

No se han realizado estudios adecuados y bien controlados en humanos. Pruebas estándares con dosis orales de 450 mg/kg/día en ratones y estudios en ratas y conejos con administraciones subcutáneas de 50 mg/kg/día, no han demostrado efectos indeseables en fetos. Sin embargo, en pruebas no estandarizadas en ratas, con dosis subcutáneas altas se presentaron anomalías fetales principalmente en la cabeza y la cola, esto también se asoció con la toxicidad materna.

Se ha detectado aciclovir en leche materna después de la administración oral de 200 mg cinco veces al día en concentraciones que varían de 0.6 a 4.1 veces los niveles plasmáticos correspondientes. Estos niveles podrían corresponder a dosis hasta de 0.3 mg/kg/día. Por lo tanto deberá evaluarse la lactancia durante el tratamiento.

2.5.10. Precauciones y relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y sobre la fertilidad⁽¹²⁾

Mutagenicidad: Por vía oral no se ha podido demostrar mutagénesis en animales. Los resultados de una extensa variedad de pruebas de mutagenicidad in vivo e in vitro indican que el aciclovir no posee un riesgo genético para el hombre. Las pruebas de mutagenicidad resultan positivas con daño cromosómico sólo a concentraciones por arriba de 1000 veces las concentraciones usuales en humanos.

Carcinogenicidad: Ensayos en ratas y ratones usando dosis orales diarias de 50, 150 y 450 mg/kg de peso corporal no han demostrado evidencia de carcinogénesis.

Fertilidad: En estudios de reproducción usando dosis orales diarias de 450 mg/kg de peso en ratones y dosis subcutáneas diarias de 25 mg/kg de peso en ratas, no se observó una evidencia relevante de algún deterioro en la fertilidad.

Se han reportado efectos adversos reversibles sobre la espermatogénesis asociados con la toxicidad general en ratas y perros, sólo con dosis sistémicas muy superiores a las empleadas terapéuticamente.

Los estudios realizados en dos generaciones de ratones no revelaron efecto alguno del aciclovir sobre la fertilidad cuando fue administrado por vía oral.

No hay ninguna experiencia del efecto de aciclovir sobre la fertilidad de las mujeres y se ha demostrado que no hay ningún efecto definitivo sobre la cuenta y la morfología de los espermatozoides en el hombre.

2.5.11. Dosis y vías de administración⁽¹²⁾

El aciclovir se administra para el tratamiento inicial en infecciones genitales por herpes o para el tratamiento de episodios recurrentes.

Dosis para adultos

Herpes simple: 200 mg de aciclovir cada cuatro horas (cinco veces al día) durante cinco días en infecciones iniciales, pero en infecciones iniciales graves se prolonga el tratamiento.

En la supresión de las infecciones por herpes simple en pacientes inmunocompetentes, la dosis indicada es de 200 mg de aciclovir cuatro veces al día o 400 mg dos veces al día.

Para la profilaxis de las infecciones por herpes simple en pacientes inmunocomprometidos, la dosis es de 200 mg cuatro veces al día o 400 mg de aciclovir dos veces al día.

En pacientes gravemente inmunocomprometidos o con alteraciones en la absorción intestinal, la dosis se duplica a 400 mg o en este caso se puede considerar la administración intravenosa.

Herpes zoster: El tratamiento para infecciones por herpes zoster, es de 800 mg de aciclovir, cinco veces al día (cada cuatro horas omitiendo la dosis de la noche), de

Antecedentes

7-10 días. El resultado es mejor cuando el tratamiento se inicia en cuanto se presentan las primeras manifestaciones en la piel. Para herpes zoster oftálmico la dosis es de 600 mg de aciclovir, cinco veces al día (cada cuatro horas) por 10 días.

Dosis para niños: En infecciones por herpes simple y para la profilaxis de infecciones en pacientes inmunocomprometidos, las dosis para niños mayores de dos años son las mismas que para los adultos. A los niños menores de dos años se les debe administrar la mitad de la dosis para adulto.

Dosis en pacientes con edad avanzada: En estos casos la eliminación del aciclovir declina junto con la depuración de creatinina. En estos pacientes se debe tener una hidratación adecuada cuando se administran dosis elevadas.

Dosis para pacientes con deterioro en la función renal: En estos pacientes se debe tener una atención especial para reducir las dosis o frecuencia de administración de aciclovir en base al grado de mal funcionamiento renal.

En el tratamiento de infecciones por herpes zoster en pacientes con una depuración de creatinina menor a 10 mL/min, la dosis es de 800 mg dos veces al día en intervalos de 12 horas.

Para pacientes con una depuración de creatinina de 10 a 25 mL/min, la dosis es de 800 mg tres o cuatro veces al día a intervalos de seis a ocho horas.

2.6. Cuantificación de aciclovir en fluidos biológicos⁽¹⁶⁾

La cuantificación de aciclovir en muestras biológicas trae consigo retos significantes porque este fármaco tiende a ser estructuralmente similar a sustancias endógenas. Esto hace al análisis complicado y requiere el uso de metodología analítica altamente selectiva. Sin embargo el aciclovir y algunos fármacos relacionados tienden a ser metabolizados a productos que pueden coeluir con el compuesto de interés. El aciclovir puede ser metabolizado principalmente a 9-carboximetoximetil guanina (14%) y de manera menos extendida a 8-hidroxi-9-[2-hidroxiyetoxi]metil]guanina (< 0.2%).

El aciclovir después de más de dos décadas de uso terapéutico, ha demostrado que es bien tolerado en una amplia variedad de enfermedades, poblaciones y grupos de diversas edades. Sin embargo, recientes reportes de posibles efectos neurotóxicos de aciclovir en pacientes con daño renal han renovado el interés en identificar las razones de las variaciones entre pacientes en la cinética del fármaco.

El aciclovir y sus compuestos relacionados presentan una gran variabilidad intra e Inter Individual en su absorción, distribución, metabolismo y eliminación lo que hace que el rango de concentraciones que necesita ser medido por los métodos analíticos sea bastante amplio.

Varios estudios analíticos han sido llevados a cabo para determinar la cantidad de fármaco en preparaciones farmacéuticas, estudios farmacocinéticos y optimización de las dosis de aciclovir. Las concentraciones del fármaco fueron medidas por técnicas inmunológicas y por CLAR en fase reversa.

El radioinmunoensayo^(17, 18) y el inmunoensayo^(19, 20) son muy sensibles, pero costosos; el gran número de pasos en el procedimiento experimental y la necesidad de desarrollar el antisuero o los anticuerpos monoclonales hacen a estos métodos desventajosos.

Sin embargo una metodología analítica altamente selectiva es requerida porque es difícil medir la concentración de agentes antivirales en una matriz biológica mostrando estos fármacos una estructura química bastante similar a algunas sustancias endógenas. Las técnicas cromatográficas han sido ampliamente usadas para el análisis de aciclovir y sus compuestos relacionados en investigación farmacocinética así como para el monitoreo terapéutico del fármaco en muestras biológicas.

Tabla 1. Métodos analíticos por CLAR para cuantificar aciclovir en fluidos biológicos

Referencia	Columna Cromatográfica	Fase Móvil	Fluido Biológico	Vol. de Muestra (mL)	Estándar Interno
G. Land y col. ⁽²¹⁾	Zorbax ODS, 250 x 4.6 mm I.D., 5 µm	Acetato de sodio 0.005 M: Acido heptanosulfónico 0.0025 M pH 6.5	Plasma Orina	0.5	Oxipurinol
R.L. Smith y cols. ⁽²²⁾	PRP-1, 150 x 4.2 mm I.D., 10 µm	Metanol: ácido clorhídrico 0.1 M: SHS 0.1 M: Cloruro de sodio 0.25 M (10:10:20:60)	Plasma	0.25	----
J.P. Sommadossi Y col. ⁽²³⁾	RP-18, 250 x 4 mm I.D., 5 µm	Acetonitrilo:Ácido heptanosulfónico 5 mM y solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM pH 2.6 (2.5:97.5)	Plasma	0.2	----
H. Mascher y cols. ⁽²⁴⁾	Nucleosil 120 3C ₁₈ , 80 x 4 mm I.D., 3 µm	Acetonitrilo: ácido perclórico 0.02 M (45:55)	Plasma	1.0	----
P. Nebinger y col. ⁽²⁵⁾	RP-8 125 x 4 mm I.D., 5 µm	Metanol: solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M con ácido 1-octanosulfónico 0.05 M pH 3.0 (5:95)	Plasma	0.5	Guanosina 100 µg /mL
K.J. Swart y cols. ⁽²⁶⁾	Novapak C ₁₈ 150 x 3.9 mm I.D., 4 µm	Metanol: fosfato ácido disodio 0.01 M con octanosulfonato de sodio 0.01 M pH 2.8 (7:93)	Plasma	0.5	----
N.M. Volpato y cols. ⁽²⁷⁾	Vydac C ₁₈ 250 x 4.6 mm I.D., 5µm	Agua desionizada	Piel	1.2 x 10 ⁻³ cm ³	----
J.O. Svensson y cols. ⁽²⁸⁾	Ultrasphere ODS, 75 x 4.6 mm I.D., 3 µm	Acetonitrilo: solución amortiguadora de fosfatos 30 mM con dodecil sulfato 5 mM pH 2.1(18:82)	Plasma Orina	0.5 0.1	----
R. Boulieu y cols. ⁽²⁹⁾	Hypersil ODS, 150 x 4.6 mm I.D., 3 µm	Fosfato de potasio 0.02 M pH 3.5	Plasma	0.5	----
K.K. Peh y col. ⁽³⁰⁾	LiCrosorb RP-8 250 x 4 mm I.D., 7 µm	Acetonitrilo: ortofosfato ácido disodio 0.02 M (1:99) pH 2.5	Plasma	0.25	----
A. Jankowski y cols. ⁽³¹⁾	Supelcosil LC 18 DB, 7.5 x 4.6 mm I.D., 3 µm	Solución amortiguadora de acetonitrilo/glicina 100 mM pH 2.3 (3:97)	Plasma	0.5	Guanosina 100 µg /mL
C. Pham-Huy y cols. ⁽³²⁾	SymmetryShield RP-8, 250 x 4.6 mm I.D., 5 µm	Acetonitrilo:solución amortiguadora de sulfato de amonio 0.025 M pH 4.0 (2:98)	Plasma Orina	0.2	1-metilguanosina 20 µg/mL
R.A. Bangaru y cols. ⁽³³⁾	Novaflex C ₁₈ , 300 x 4.6 mm I.D., 10 µm	Metanol: octanosulfonato de sodio 0.05 M pH 2.5 (8:92)	Plasma	1.0	----
M. Fernández y cols. ⁽³⁴⁾	LiChrospher 100 RP-18 250 x 4 mm I.D., 5 µm	Acetonitrilo: solución amortiguadora de fosfatos 30 mM con duodecil sulfato de sodio 5mM pH 2.6 (18:82)	Plasma	----	5'-N-metil carboxiamidoadenosina (MECA)

<i>Solvente de extracción</i>	<i>Volumen de inyección (μL)</i>	<i>Detección UV ó Fluorescencia(nm)</i>	<i>Recobro (%)</i>	<i>Límite de detección (ng/mL)</i>	<i>Rango lineal (μg/mL)</i>
Precipitación Al(SO ₄) ₃ y Ba(OH) ₂	60 15	254	----	1.0 μM 10 μM	0 – 50 μM
Precipitación con fase móvil y TFA	100	254	≥ 90	12 ng	0.5 – 12.0
Precipitación con TFA al 50%	100	254	95 – 98	100	0.1 – 5.0
Precipitación con HClO ₄ 3 M	20	λ _{ex} = 260 λ _{em} = 375	102 - 113	6.0 – 10	0.01 – 12.40
Ultrafiltración	----	254	97 – 100	50	0.5 - 100
Gilson ASPEC con tC ₁₈ , Sep-Pak Vac 100 mg	130	254	82 – 88	----	0.01 – 1.2
Agua desionizada y HClO ₄ 1 N	50	254	93 – 99	----	0.15 – 15.0
Extracción en fase sólida Sep-Pak Light C ₁₈	20	λ _{ex} = 285 λ _{em} = 380	> 90	0.12 μM suero 0.6 μM orina	0.5 – 16.0 μM
Precipitación con HClO ₄ al 35%	20	254	94 – 96	2 ng	0.1 – 50
Precipitación con HClO ₄ al 60-62%	50	λ _{ex} = 270 λ _{em} = 380	96	30	0.0625 – 4.0
Precipitación con HClO ₄ al 12%	20	λ _{ex} = 260 λ _{em} = 375	84-90 plasma > 80 E.I.	10	0.025 – 1.2
Precipitación con HClO ₄ al 5%	50	254	91 plasma 96 orina 94-95 E.I.	50	0.5 – 20.0
Precipitación con HClO ₄ al 7%	100	254	87 – 96	----	0.02 – 5.0
Extracción en fase sólida cartuchos waters Oasis HLB (1 mL, 30 mg)	100	250 y 260	94.7 – 109.7	6.0	0.05 – 1.80

2.7. Validación de Métodos Bioanalíticos^(2, 3, 35, 36, 37, 38)

La validación es la evidencia experimental documentada que incluye todos los procedimientos para demostrar que un método analítico es adecuado en la determinación cuantitativa de un analito en una matriz biológica y cumple con el propósito para el cual fue diseñado.

Antes de la utilización del método para un análisis de muestras, el analista debe obtener suficientes datos que evalúen el desempeño y capacidad del método para obtener resultados confiables. Esta evaluación se realiza mediante un estudio de validación.

Los parámetros de validación de mayor relevancia establecidos por diferentes organismos regulatorios (FDA, ICH, NOM), son los siguientes: linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación, límite de detección, selectividad, estabilidad de la muestra analítica y porcentaje de recuperación.

2.7.1. Linealidad^(2, 3, 39)

La linealidad se define como la relación matemática existente entre la concentración a evaluar con respecto a la respuesta observada. Esta respuesta puede ser la absorción de la luz ultravioleta, la emisión de fluorescencia, la generación de una corriente eléctrica, etc. En la mayoría de los casos la relación entre la concentración y la respuesta es lineal. Sin embargo, en algunas ocasiones, como en el caso del radioinmunoanálisis, aunque la relación no es

lineal, es adecuadamente descrita por una ecuación determinada. Es indispensable que la linealidad se evalúe en todo el intervalo de concentraciones que se determinarán (intervalo de calibración), ya que en función de la ecuación obtenida en la calibración se realiza la cuantificación de las concentraciones por interpolación. No es recomendable estimar concentraciones por extrapolación. El número de estándares de calibración requeridos para definir una ecuación de calibración dependerá del rango de concentraciones a evaluar y de las características de la respuesta del detector en función de la concentración.

La linealidad es la capacidad de un método analítico en un intervalo de trabajo para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra. Se evalúa tanto la linealidad del sistema como la del método. De acuerdo a las especificaciones, el sistema se considera lineal si el coeficiente de correlación es mayor o igual a 0.99. Para que el método se considere lineal el coeficiente de correlación también debe ser mayor a 0.99.

Si y es la respuesta y x es la concentración, el coeficiente de correlación (r) se obtiene mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados como:

$$r = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

donde las sumas son sobre el número de datos (n).

2.7.2. Precisión^(2, 3, 35, 39)

La precisión es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto. La precisión se evalúa conociendo la repetibilidad y la reproducibilidad.

La repetibilidad se define como la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones. Para considerar un método repetible, el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

El coeficiente de variación se calcula como la desviación estándar (S_x) entre la concentración promedio (\bar{x}):

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

La reproducibilidad intralaboratorio, es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio pero en diferentes condiciones de análisis, tales

como días, equipo, columnas o analistas. Un método es reproducible cuando el coeficiente de variación no es mayor del 15%, el cual se determina con la fórmula expresada anteriormente.

2.7.3. Exactitud^(2, 3, 35, 39)

La exactitud es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Se evalúa determinando la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones experimentales, con respecto a la concentración nominal de la muestra. Se calcula de la manera siguiente:

$$\% \text{ Desviación Absoluta} = \left| \frac{\text{Concentración Nominal} - \text{Concentración Experimental}}{\text{Concentración Nominal}} \right| \times 100$$

La concentración experimental en el caso de análisis por CLAR, se obtiene interpolando el valor de las alturas de los estándares de cada nivel de concentración considerados como desconocidos dentro de la ecuación derivada del análisis de regresión lineal de la curva de referencia en plasma (proveniente de pesada independiente), para obtener los valores de “concentración recuperada” o “concentración experimental”.

Para considerar el método como exacto, el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

2.7.4. Recuperación^(2, 3, 35, 37)

Las muestras biológicas que se analizarán deben ser sometidas a procesos de semipurificación. Durante estos procesos es factible que se pierda fármaco. Debido a ello es importante que se evalúe la recuperación del compuesto por analizar. En general se tolera que la recuperación del fármaco durante el proceso analítico completo pueda ser menor del 100%, pero se recomienda que sea reproducible en todas las concentraciones que corresponden al rango de calibración.

2.7.5. Límite de cuantificación^(2, 3, 35)

El límite de cuantificación corresponde al estándar de calibración más pequeño que puede ser medido de una manera fidedigna y que cumple con los criterios de exactitud y precisión. Es muy importante conocer este valor, ya que toda concentración que se encuentre por debajo de este límite no puede ser utilizada en un análisis farmacocinético y estadístico porque todo valor inferior a este no es cuantificado adecuadamente. Como ya se mencionó anteriormente, las concentraciones se deberán determinar por interpolación en la curva de calibración, y el punto más bajo de calibración que reúne los requisitos de exactitud y precisión será la concentración mínima cuantificable.

Se establece que el punto tiene validez como límite de cuantificación si el valor promedio de 5 réplicas cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor del 20%.

2.7.6. Límite de detección^(3, 36)

El límite de detección es la concentración mínima cuya señal puede distinguirse de la basal. Este parámetro es informativo acerca de qué tan sensible es el método, y en un momento dado, hasta qué concentraciones es factible establecer la calibración del método. Se recomienda proporcionar este parámetro con propósitos informativos, ya que como se mencionó anteriormente, es mucho más importante conocer el límite de cuantificación que el de detección.

2.7.7. Estabilidad del compuesto por analizar^(3,37)

La estabilidad de la muestra analítica es la propiedad del compuesto por analizar de conservar sus características en la matriz biológica, desde el momento del muestreo hasta su análisis. Se determina evaluando el porcentaje de desviación absoluta, el cual deberá ser menor al 15%.

Es importante conocer qué tan estable es un compuesto para que en función de ello se puedan establecer las condiciones de almacenamiento de las muestras y de trabajo de las mismas. Se recomienda una investigación de los factores que puedan afectar la concentración del fármaco en la matriz a emplear. Pueden investigarse por ejemplo: el almacenamiento, los ciclos de congelación y descongelación, la reconversión de metabolitos importantes, la estabilización de compuestos lábiles, los materiales de contacto, la preparación de la muestra, los anticoagulantes empleados, el almacenaje en autoinyectores, etc. En función de las características de estabilidad de los compuestos se emplean las condiciones

más convenientes, para garantizar que las concentraciones a determinar serán las más adecuadas. En general, es recomendable evaluar la estabilidad del compuesto en tres concentraciones distintas y por duplicado.

2.7.8. Selectividad^(3, 35, 37)

Este parámetro nos indica si el método es capaz de discernir al compuesto que nos interesa analizar de otras sustancias, ya sean exógenas o endógenas, que puedan interferir con la cuantificación del mismo. Para ello se colecta la matriz biológica proveniente de al menos seis sujetos distintos y se somete al proceso de semipurificación para después ser analizado por el método correspondiente. No debe existir señal que pudiera interferir con la cuantificación del compuesto de interés. Adicionalmente, es recomendable evaluar este parámetro contra posibles interferencias por metabolitos, productos importantes de degradación y cualquier fármaco coadministrado.

Capítulo III. Parte Experimental

3.1. Método analítico para cuantificar aciclovir en plasma

3.1.1. Estándar de aciclovir

Proveedor : Moléculas Finas de México, Lote 02/0352, Pureza 99.5%. Donado por el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Química, UNAM.

3.1.2. Material Biológico

Plasma humano donado por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco Suárez". Pruebas realizadas al plasma: P.R.P. (Sífilis), Brucella, Ags HB (Hepatitis B), HCV (Hepatitis C) y VIH (SIDA) todas con resultados negativos.

3.1.3. Reactivos

- Fosfato monobásico de potasio, J.T. Baker
- Acetonitrilo grado HPLC, Mallinckrodt
- Agua desionizada, grado HPLC
- Ácido fosfórico concentrado (85%), J.T. Baker
- Ácido perclórico concentrado (69 – 72%), Reproquifin

3.1.4. Equipos

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Shimadzu equipado con:
 - ❖ Sistema controlador modelo LC-10 AT
 - ❖ Detector de longitud de onda variable UV-VIS modelo SPD-10 AV
 - ❖ Autoinyector, modelo SIL-10 AT
 - ❖ Bomba isocrática modelo LC-10 AT
- Columna ThermoHypersil ODS C₁₈, 150 x 4.6 mm I.D., 3 μm tamaño de partícula
- Filtros para columna phenomenex ODS C₁₈, 4 mL x 3.0 mm I.D.
- Balanza analítica Sartorius
- Potenciómetro Orion Research modelo 301
- Ultrasonido Fisher Scientific FS60
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-1601
- Centrífuga Eppendorff modelo 5120
- Centrífuga SIGMA modelo 2-15
- Agitador vortex Thermolyne Maxi Mix II, modelo M37615
- Micropipeta Eppendorff de 500 a 5000 μL
- Micropipeta Eppendorff de 50 a 250 μL
- Milli-Q Water System Millipore
- Sistema de filtración de líquidos Millipore
- Membranas Millipore
 - ❖ HVLP 04700 para solventes acuosos y metanol de 0.22 μm

- ❖ GVHP 04700 para solventes orgánicos 0.45 μm

3.1.5. Preparación de soluciones

3.1.5.1. Solución estándar de aciclovir

Pesar con exactitud 10 mg de aciclovir y transferir cuidadosamente la cantidad pesada a un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver con agua desionizada grado HPLC y aforar con el mismo disolvente. Esta solución tiene una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$.

La solución estándar 200 $\mu\text{g/mL}$ de aciclovir es estable durante 6 semanas si se mantiene almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.5.2. Solución amortiguadora de Fosfato de potasio 0.1 M pH= 3.5

Pesar 13.6090 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), transferir la cantidad pesada a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver y aforar con agua desionizada grado HPLC. Ajustar el pH a 3.5 con ácido fosfórico al 10%. Filtrar la solución a través del sistema de líquidos Millipore por membrana porosa de 0.45 μm .

3.1.5.3. Fase móvil

La fase móvil consiste en una mezcla de acetonitrilo – solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 3.5, (6 : 94 v/v).

Medir con probeta graduada de 1000 mL, 940 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 3.5. Con probeta graduada de 100 mL, medir 60 mL de acetonitrilo grado HPLC previamente filtrado. Hacer la mezcla en un frasco de 1000 mL.

Desgasificar la fase móvil empleando un equipo de ultrasonido durante 30 minutos.

3.1.6. Curva de calibración de aciclovir en agua desionizada y plasma

En la tabla 2 se muestra la preparación de la curva de calibración de aciclovir en agua desionizada y plasma. El intervalo de concentraciones para la curva es de 0.10 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 2. Curva patrón de aciclovir en agua desionizada y plasma

<i>Solución</i>	<i>Solución estándar de aciclovir ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Alícuota (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)</i>
1	200	0.10	10	2.00
2	200	0.075	10	1.50
3	2.00	5.0	10	1.00
4	1.00	5.0	10	0.50
5	0.50	5.0	10	0.25
6	0.25	4.0	10	0.10

3.1.7. Puntos controles de aciclovir en plasma

En la tabla 3 se muestra la preparación de los puntos controles de aciclovir en plasma.

Tabla 3. Puntos controles de aciclovir en plasma

<i>Solución</i>	<i>Solución estándar de aciclovir ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Alícuota (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Concentración Final ($\mu\text{g/mL}$)</i>
1	2.0	1.0	10	0.20
2	1.5	5.0	10	0.75
3	200	0.090	10	1.80

3.2. Optimización del método analítico para cuantificar aciclovir en plasma

El método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución utilizado para cuantificar aciclovir en plasma se basó en el método descrito por R. Boulieu, C. Gallant, N. Silberstein⁽²⁹⁾.

3.2.1. Selección de la longitud de onda máxima de absorción

Para seleccionar la longitud de onda máxima de absorción en la cuantificación del fármaco, se realizó un barrido espectrofotométrico en la región de 190 a 350 nm del UV a una solución con 10 $\mu\text{g/mL}$ de aciclovir en agua desionizada. El máximo de absorción del aciclovir se registró en 254 nm. Esta longitud de onda fue la escogida para la cuantificación del compuesto.

3.2.2. Selección de la columna cromatográfica

Se realizaron pruebas con las siguientes columnas cromatográficas:

- Hypersil ODS C₁₈, 4.6 x 250 mm D.I., 5 μ tamaño de partícula, ThermoQuest.
- Hypersil ODS C₁₈, 4.0 x 125 mm D.I., 3 μ tamaño de partícula.
- Termohypersil ODS C₁₈, 4.6 x 150 mm D.I., 3 μ tamaño de partícula.

Para la elección de la columna se consideró lo siguiente:

1. Tiempo de retención (t_R) del aciclovir

Era importante una respuesta cromatográfica del fármaco que estuviera libre de señales en el mismo tiempo de retención originadas por compuestos endógenos. Así mismo, el análisis de la muestra debía lograrse en tiempos cortos, ya que se requería un método analítico rápido para el análisis de numerosas muestras.

2. Simetría < 2

Se establecieron condiciones cromatográficas en sistema que permitieron detectar con una buena simetría el pico de interés. La obtención de picos anchos y coleados se traduce en una mala integración, y por lo tanto, en una cuantificación errónea del fármaco.

3.2.3. Optimización de la fase móvil

Se evaluaron 15 fases móviles diferentes. La composición para cada una de ellas se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Optimización de la fase móvil

<i>Fase Móvil</i>	<i>Composición</i>	<i>Proporción (v / v)</i>	<i>Flujo mL/min</i>
1	Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.02 M pH 3.5	100	1.5-2.0
2	Metanol: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.02 M pH = 3.5	10 : 90	2.0
3	Acetonitrilo: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.02 M pH = 3.5	10 : 90	2.0
4	Metanol: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.02 M pH = 3.5	10 : 90	0.6
5	Metanol: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.02 M pH = 3.5	5 : 95	0.5-1.0
6	Metanol: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.02 M pH = 3.5	5 : 95	0.6
7	Metanol: Ácido Octanosulfónico 10 mM: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.2 M pH 3.5	6 : 94	0.6
8	Metanol: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.1 M pH = 3.5	6 : 94	0.6
9	Metanol: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.1 M pH = 3.5	3 : 97	0.6
10	Acetonitrilo: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.1 M pH = 3.5	15 : 85	0.6
11	Acetonitrilo: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.1 M pH = 3.5	2 : 98	0.6
12	Acetonitrilo: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.1 M pH = 3.5	3 : 97	0.6
13	Acetonitrilo: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.1 M pH = 3.0	6 : 94	0.6
14	Acetonitrilo: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.1 M pH = 4.0	6 : 94	0.6
15	Acetonitrilo: Solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.1 M pH = 3.5	6 : 94	0.6

La fase móvil seleccionada fue la número 15, ya que esta proporcionó el mejor tiempo de retención, la mayor respuesta y la mejor resolución del pico del fármaco.

3.2.4. Optimización del método para extraer aciclovir del plasma

Con el fin de encontrar el procedimiento mas adecuado para extraer aciclovir de plasma, se hicieron algunas pruebas tomando como referencia los métodos de extracción descritos por R. Boulieu y cols.⁽²⁹⁾ y K.K. Peh y col.⁽³⁰⁾. Se realizaron extracciones del fármaco en plasma empleando disoluciones de HClO₄ al 7.0%, 35.0% y 69-72% (concentrado). También se realizaron extracciones utilizando una mezcla de ZnSO₄ 10% y HClO₄ 35% (50 : 50 v/v).

3.3 Validación del sistema

3.3.1. Linealidad y precisión del sistema

Para evaluar la linealidad del sistema, se prepararon a partir de pesadas independientes, tres curvas de calibración de aciclovir en agua desionizada con seis concentraciones diferentes en el intervalo de 0.10 a 2.0 µg/mL como se indica en la tabla 2.

Se graficó el valor de la altura de los picos de aciclovir con respecto a la concentración nominal. Por medio de un ajuste de mínimos cuadrados, se determinó para cada curva de calibración la ordenada al origen (b), la pendiente (m), el coeficiente de correlación (r)^(2, 3).

Se considera que el sistema es lineal si el coeficiente de correlación (r) es mayor o igual a 0.99.

Para evaluar la precisión del sistema se emplearon los resultados de linealidad. De estos resultados el coeficiente de variación de la altura de los picos a cada nivel de concentración debe ser igual o menor al 2 %.

3.4. Validación del método analítico para cuantificar de aciclovir en plasma

Para asegurar que el método analítico es confiable en la cuantificación de aciclovir, se validó siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 en lo que respecta a "Criterios y requisitos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de Bioequivalencia"⁽²⁾. Los parámetros evaluados se describen a continuación:

3.4.1. Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó preparando 3 curvas de calibración en plasma a partir de pesadas independientes del estándar de aciclovir en el intervalo de 0.1 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras se procesaron de acuerdo a la técnica analítica descrita en la figura 3.

Para cada curva de calibración se graficó la altura de los picos con respecto a la concentración nominal de aciclovir y por medio de un ajuste de mínimos cuadrados se determinó la ordenada al origen (b), la pendiente (m) y el coeficiente de correlación (r)⁽³⁾.

Se considera que el método es lineal si el coeficiente de correlación (r) es mayor o igual a 0.99⁽²⁾.

3.4.2. Precisión del método

La precisión del método se determinó tomando en cuenta los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio analizando tres concentraciones conocidas de aciclovir en plasma: alta, media y baja (1.80, 0.75 y 0.20 $\mu\text{g/mL}$). Estas concentraciones son conocidas como puntos control y son diferentes a los puntos de la curva de calibración pero se encuentran dentro del intervalo de trabajo⁽²⁾.

3.4.2.1. Repetibilidad del método

La repetibilidad se evaluó analizando en un mismo día por quintuplicado tres concentraciones conocidas de aciclovir (1.80, 0.75, y 0.20 $\mu\text{g/mL}$) bajo condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. Las muestras se procesaron de acuerdo al procedimiento descrito en la figura 3.

Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada nivel de concentración.

El método se considera repetible si el coeficiente de variación no es mayor al 15%⁽²⁾.

3.4.2.2. Reproducibilidad del método

Para conocer la reproducibilidad del método analítico se analizaron los puntos control (1.80, 0.75 y 0.20 $\mu\text{g/mL}$) por duplicado durante tres días, conservando las mismas condiciones de equipo, laboratorio y analista.

Para cada nivel de concentración, se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Se considera que el método es reproducible si el coeficiente de variación no es mayor al 15 % ⁽²⁾.

3.4.3. Exactitud del método

Se evaluó la exactitud del método a partir de los resultados obtenidos de repetibilidad y reproducibilidad, calculando el porcentaje de desviación absoluta a cada nivel de concentración con respecto a la concentración nominal de la muestra.

El método se considera exacto si el valor promedio de las determinaciones en cada nivel evaluado de los datos de repetibilidad y reproducibilidad se encuentran dentro del $\pm 15\%$ de valor nominal de concentración⁽²⁾.

3.4.4. Recuperación absoluta

Se determinó analizando por quintuplicado tres concentraciones conocidas de aciclovir 1.80, 0.75 y 0.20 $\mu\text{g/mL}$ en agua desionizada y plasma. Las muestras en solución se prepararon conforme al procedimiento anteriormente utilizado en la validación del sistema y las muestras plasmáticas de acuerdo al método de extracción descrito en la figura 3.

Para conocer el porcentaje de aciclovir que se recobró, se comparó la altura del pico obtenida en plasma con respecto a la altura obtenida en solución acuosa, considerando esta última como el 100% en cada caso, para cada nivel de concentración^(2, 37).

3.4.5. Límite de cuantificación

Se evaluó este parámetro analizando por quintuplicado la concentración más baja de la curva correspondiente a 0.10 µg/mL de aciclovir en plasma para el rango de trabajo. Se determinó el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta de los resultados obtenidos.

Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor a 20%^(2, 37).

3.4.6. Límite de detección

Para conocer el límite de detección se preparó la concentración 0.05 µg/mL a partir de la solución 0.10 µg/mL de aciclovir en plasma. Esta concentración se estableció como el límite de detección ya que su señal fue tres veces mayor a la señal del ruido de fondo⁽³⁶⁾.

3.4.7. Estabilidad de la muestra analítica

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que el aciclovir permaneció estable en la matriz biológica durante su manejo, almacenamiento y procesamiento⁽²⁾. Se evaluó la respuesta de la concentración del compuesto en muestras preparadas por duplicado a tres niveles de concentración ya conocidos dentro del intervalo de trabajo bajo las siguientes condiciones:

3.4.7.1. Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente⁽²⁾

Para evaluar este parámetro se prepararon por duplicado, réplicas de aciclovir en plasma a concentraciones 1.80, 0.75 y 0.20 $\mu\text{g/mL}$, las cuales fueron procesadas y mantenidas a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron al tiempo cero, 8, 16 y 24 horas.

3.4.7.2. Estabilidad de la muestra almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 mes⁽²⁾

Se prepararon por duplicado los puntos control de aciclovir a las concentraciones ya conocidas los cuales se mantuvieron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El análisis de las muestras se llevó a cabo al tiempo cero, 10, 20 y 30 días posteriores a su preparación.

3.4.8. Selectividad del método^(2, 37)

La selectividad del método se estableció analizando muestras blanco de plasma preparadas a partir de un pool (6 sujetos), una muestra de aciclovir en plasma 2.0

Parte Experimental

$\mu\text{g/mL}$ y muestras de plasma a las cuales se les adicionó Cafeína 20 $\mu\text{g/mL}$, Naproxen sódico 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ y Paracetamol 20 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras se procesaron de acuerdo al método de precipitación descrito en la figura 3.

El método analítico se considera selectivo si no existen interferencias en la cuantificación de aciclovir.

Capítulo IV. Resultados y análisis de resultados

4.1. Optimización del método analítico para la cuantificación de aciclovir en plasma

Los resultados obtenidos de la optimización del método analítico para la cuantificación de aciclovir se presentan a continuación:

- Experimentalmente encontramos que el máximo del espectro de absorción del aciclovir está en una longitud de onda de 254 nm, siendo esta la utilizada para analizar las muestras. Las validaciones y los estudios de bioequivalencia que se encontraron en la literatura utilizan frecuentemente la misma longitud de onda para cuantificar aciclovir.
- Se seleccionó la columna cromatográfica Termohypersil ODS C₁₈, 4.6 x 150 mm D.I., 3 μm tamaño de partícula. En esta columna el pico de aciclovir presentó la mayor altura así como la mejor resolución.

Tabla 5. Optimización de la columna cromatográfica

<i>Columna</i>	<i>Resultados</i>
Hypersil ODS C ₁₈ , 4.6 x 250 mm D.I., 5μ tamaño de partícula, ThermoQuest.	T _R muy largo, pico de aciclovir pequeño, ancho y cooleado.
Hypersil ODS C ₁₈ , 4.0 x 125 mm D.I., 3μ tamaño de partícula.	T _R corto, interferencia del pico de aciclovir con picos de plasma.
Termohypersil ODS C ₁₈ , 4.6 x 150 mm D.I., 3μ tamaño de partícula.	T _R adecuado, separación del compuesto de interés de los picos de plasma, buena simetría del pico de aciclovir.

- La fase móvil utilizada consistió en una mezcla de acetonitrilo : solución amortiguadora de fosfato diácido de potasio 0.1 M pH = 3.5 (6 : 94 v/v). El porcentaje de acetonitrilo dentro de la fase móvil fue del 6% porque el analito presentaba una buena respuesta (altura) y los picos del plasma interferían menos. La velocidad de flujo más adecuada fue de 0.6 mL/min ya que así se lograba la mejor separación entre el pico de aciclovir y los picos del plasma.

Tabla 6. Resultados de la optimización de la fase móvil

<i>Fase Móvil</i>	<i>Resultados</i>
1	T _R muy largo, pico de aciclovir ancho y coleado.
2	T _R corto, pico de aciclovir coleado.
3	T _R corto, buena simetría del pico de interés pero se presentan interferencias de plasma.
4	T _R largo, pico de aciclovir coleado y con baja respuesta.
5	T _R adecuado, pico de aciclovir coleado y ancho así como respuesta baja.
6	T _R adecuado, pico de aciclovir ancho, presenta coleo y la respuesta es baja.
7	T _R adecuado, pico de aciclovir ancho y coleado, se observan interferencias del plasma.
8	T _R adecuado, pico de aciclovir coleado con interferencias de plasma.
9	T _R largo, pico de aciclovir coleado con interferencias de picos de plasma.
10	No se observó la señal del compuesto, el aciclovir no se retiene en la columna .
11	T _R largo, pico de aciclovir coleado y con respuesta baja .
12	T _R disminuye, la respuesta del pico de aciclovir aumenta y el coleo disminuye.
13	T _R adecuado, el pico de aciclovir presenta una buena señal y sin coleo. Sin embargo, hay interferencias de plasma.
14	T _R adecuado, el pico de aciclovir tiene una buena respuesta, no se observa coleo pero hay interferencias con los picos de plasma.
15	T _R adecuado, el pico de aciclovir presenta buena simetría y respuesta. No se observan interferencias con las señales de picos del plasma.

Resultados y análisis de resultados

- Se realizaron extracciones del fármaco en plasma empleando soluciones de HClO_4 al 7.0% y 35.0% y una mezcla de ZnSO_4 10% y HClO_4 35% (50 : 50 v/v). Las muestras presentaban interferencia de los picos del plasma con el pico de aciclovir, lo cual no permitía una cuantificación adecuada del fármaco.

Utilizando HClO_4 concentrado para precipitar proteínas del plasma, se logró que en el tiempo de retención del aciclovir no se presentaran interferencias con los picos del plasma y se obtuvo un alto porcentaje de recuperación del fármaco así como reproducibilidad en los resultados.

En la figura 3 se muestra el diagrama de flujo del método analítico optimizado para extraer aciclovir.

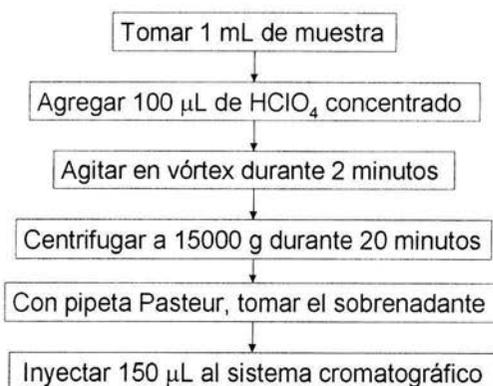


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de extracción de aciclovir en plasma

Por lo tanto, las condiciones cromatográficas para el análisis de las muestras son las siguientes:

Condiciones cromatográficas

Producto: Aciclovir

Fase móvil: Acetonitrilo : KH_2PO_4 0.1 M pH = 3.5 (6 : 94 v/v)

Columna: Thermohypersil ODS C_{18} , 150 x 4.6 mm D.I., 3 μm tamaño de partícula

Flujo: 0.6 mL/min

Presión: 99 - 100 kgf/cm^3

λ : 254 nm

Volumen de inyección: 150 μL

Inyector: SIL-10 AT auto inyector Shimadzu

Detector: SCL- 10 AT detector Shimadzu

Bomba: LC-10 AT Liquid Chromatograph

Temperatura: Ambiente

4.2. Validación del sistema

Para determinar la concentración de aciclovir en las muestras plasmáticas analizadas se decidió utilizar el valor de la altura de los picos en lugar del área bajo la curva de los mismos ya que así se obtiene menor variación estadística en los resultados.

4.2.1. Linealidad y precisión del sistema

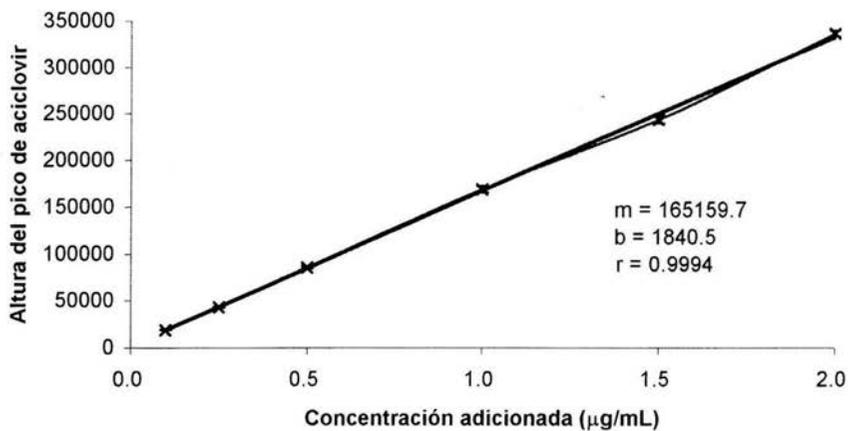
En la tabla 7 se presentan los resultados de linealidad del sistema. Los datos corresponden a las alturas de los picos de las tres curvas de calibración en solución (agua).

Tabla 7. Linealidad y precisión del sistema

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	0.10	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00			
Altura de los Picos							b	m	r
Curva 1	18404	43595	87336	172176	245632	337965	2592.6	166271.5	0.9996
Curva 2	18241	43218	85091	167960	244530	338047	1187.7	166347.8	0.9996
Curva 3	18847	42446	84179	165317	238496	332462	1741.3	162859.6	0.9994
Promedio	18497	43086	85535	168484	242886	336158	1840.5	165159.7	0.9994
D.E.	313.6	585.7	1624.7	3459.4	3841.6	3201.1			
C.V (%)	1.7	1.4	1.9	2.0	1.6	0.9			

Los resultados muestran que los coeficientes de variación a los diferentes niveles de concentración se encuentran entre 0.9% y 2.0%. La NOM-177-SSA1-1998 indica que los coeficientes de variación no deben ser mayores al 2% y el coeficiente de correlación debe de ser mayor a 0.99. Así, se demuestra que la relación matemática entre concentración y respuesta es lineal y precisa en el intervalo de concentraciones de 0.10 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$.

La figura 4 corresponde a la curva promedio de las tres curvas de calibración. Para esta curva promedio el coeficiente de regresión lineal es 0.9994.

Linealidad y precisión del sistema**Figura 4. Linealidad del sistema****4.3. Validación del método analítico para la cuantificación de aciclovir en plasma****4.3.1. Linealidad del método**

En la tabla 8 se muestran los resultados de linealidad del método analítico. Los datos presentados corresponden a la altura de los picos de las tres curvas de calibración en plasma.

Tabla 8. Linealidad del método analítico

Altura de los Picos							b	m	r
Curva 1	12986	35270	72338	145749	226323	289656	-1118.8	147483.2	0.9995
Curva 2	12413	32138	69983	139105	213259	280759	-2077.9	142079.3	0.9999
Curva 3	13750	30958	69764	139692	216495	292519	-4216.7	147379.1	0.9998
Promedio	13050	32789	70695	141515	218692	287645	-2471.1	145647.2	0.9992
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	0.10	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00			
Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)									
Curva 1	0.0956	0.2467	0.4981	0.9958	1.5422	1.9716			
Curva 2	0.1020	0.2408	0.5072	0.9937	1.5156	1.9907			
Curva 3	0.1219	0.2387	0.5020	0.9765	1.4976	2.0134			
Promedio	0.1065	0.2421	0.5024	0.9887	1.5184	1.9919			
D.E.	0.01	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02			
C.V%	12.9	1.7	0.9	1.1	1.5	1.0			
Desv. Abs. (%)	6.5	3.1	0.5	1.1	1.2	0.4			

Se puede observar que el coeficiente de correlación en los tres casos es mayor a 0.99 y el coeficiente de variación se encuentra entre 0.9% y 12.9%. Por lo mencionado anteriormente y de acuerdo a los criterios establecidos que indican que el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%, la relación matemática entre concentración y respuesta es continua y reproducible dentro del intervalo de 0.10 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$.

A continuación se presenta la gráfica de linealidad del método analítico. El coeficiente de correlación promedio es de 0.9997 lo que indica una relación directamente proporcional entre concentración y respuesta en el rango de trabajo de 0.10 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$.

Linealidad del método analítico

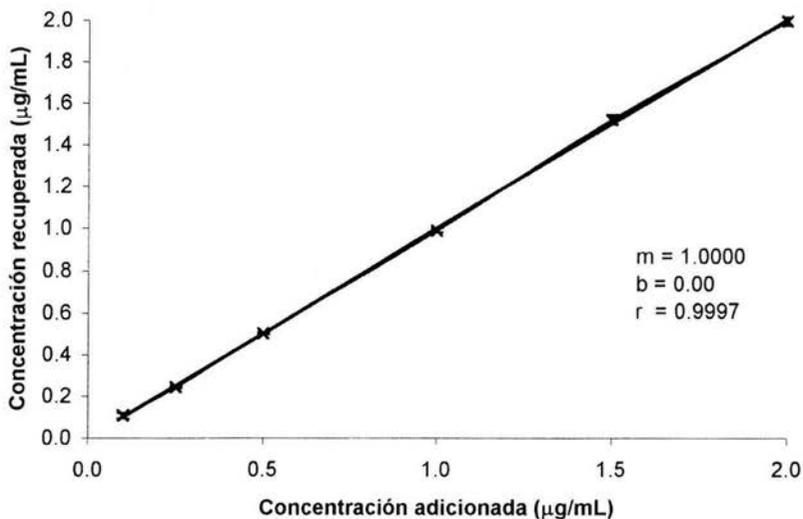


Figura 5. Linealidad del método

4.3.2. Precisión del método**4.3.2.1. Repetibilidad del método**

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de repetibilidad del método analítico al analizar en un mismo día por quintuplicado, tres concentraciones conocidas de aciclovir (1.80, 0.75 y 0.20 µg/mL) bajo las mismas condiciones de trabajo y el mismo analista.

Tabla 9. Repetibilidad del método analítico para cuantificar aciclovir en plasma

Muestra	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		
1	0.2000	0.7289	1.8041
2	0.1952	0.7377	1.7690
3	0.1972	0.7140	1.7258
4	0.1963	0.7130	1.7108
5	0.1964	0.7154	1.6946
Promedio	0.20	0.72	1.74
D.E.	0.00	0.01	0.04
C.V (%)	0.9	1.5	2.6
Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	0.20	0.75	1.80
Desviación absoluta (%)	1.5	3.8	3.3

Los coeficientes de variación son de 2.6% para el nivel alto, 1.5% para el nivel medio y 0.9% para el nivel bajo. Ninguno de los porcentajes mencionados rebasa el límite máximo establecido del 15% por lo que el método analítico para cuantificar aciclovir en plasma se considera repetible en el intervalo de concentraciones de 0.10 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$.

4.3.2.2. Reproducibilidad del método

Los resultados de reproducibilidad del método analítico se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar aciclovir en plasma

Día	Réplica	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		
1	1	0.2000	0.7289	1.8041
	2	0.1972	0.7377	1.769
2	1	0.1744	0.7262	1.8173
	2	0.1814	0.7219	1.8579
3	1	0.2139	0.7871	1.8701
	2	0.2139	0.7624	1.8638
Promedio		0.1968	0.7440	1.8304
D.E.		0.02	0.03	0.04
C.V (%)		8.3	3.4	2.2
Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)		0.20	0.75	1.80
Desviación absoluta (%)		1.6	0.8	1.7

Los coeficientes de variación obtenidos para los puntos control 1.80, 0.75 y 0.20 $\mu\text{g/mL}$ durante los tres días de análisis son 2.2%, 3.4% y 8.3% respectivamente. La concentración menor de aciclovir 0.20 $\mu\text{g/mL}$ es la que presenta mayor variación.

Considerando que el criterio de aceptación establecido para esta determinación indica que el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%, los resultados muestran que el método analítico es reproducible bajo las mismas condiciones de análisis en tres días diferentes de trabajo.

Los resultados de los parámetros de validación repetibilidad y reproducibilidad, demuestran que el método analítico para cuantificar aciclovir en plasma es preciso ya que los coeficientes de variación no son mayores al 15%.

4.3.3. Exactitud del método

En la tabla 11 se encuentran los resultados de repetibilidad y reproducibilidad a los tres niveles de concentración evaluados, así como la concentración experimental promedio y el porcentaje de desviación absoluta que indica la variación con respecto a la concentración nominal.

Tabla 11. Exactitud del método analítico

Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)			Desviación absoluta (%)
	Repetibilidad	Reproducibilidad	Promedio	
0.20	0.1970	0.1968	0.1969	1.5
0.75	0.7218	0.744	0.7329	2.3
1.80	1.7409	1.8304	1.7857	0.8

El método analítico para la cuantificación de aciclovir en plasma es exacto porque cumple con la especificación establecida y la desviación absoluta de la concentración experimental promedio a cada nivel evaluado, está dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

4.3.4. Recuperación absoluta

En la tabla 12 se muestra el porcentaje de recobro de aciclovir en plasma para los controles bajo, medio y alto preparados por quintuplicado.

Tabla 12. Porcentaje de recuperación absoluta de aciclovir en plasma

<i>Estándar</i>	Estándar en agua (no extraído)	Estándar en plasma (extraído)	% Recobro
	Altura del pico	Altura del pico	
Bajo 0.20 µg/mL	27151	21158	77.9
	27500	21851	79.5
	28095	21896	77.9
	28145	22336	79.4
	28963	22809	78.8
Promedio	27971	22010	78.7
Medio 0.75 µg/mL	117902	109535	92.9
	118232	110963	93.9
	119990	107124	89.3
	119010	106974	89.9
	121335	107346	88.5
Promedio	119294	108388	90.9
Alto 1.80 µg/mL	283225	283225	100.0
	277543	277543	100.0
	270563	270563	100.0
	274368	268146	97.7
	272145	265536	97.6
Promedio	275569	273003	99.1

Se observa que el porcentaje de recobro para la concentración 0.20 µg/mL es de 78.7%, para 0.75 µg/mL es 90.9% y para 1.80 µg/mL es 99.1%, siendo el recobro promedio para aciclovir de 89.6%.

La NOM-177-SSA1-1998 indica que el porcentaje de recobro no necesariamente debe ser del 100% pero si reproducible en cada nivel de concentración. El método de precipitación de proteínas con HClO_4 cumple con el criterio de aceptación.

4.3.5. Límite de cuantificación

En la tabla 13 se presentan los resultados de las alturas correspondientes a los picos de aciclovir con las que se evaluó el límite de cuantificación del método analítico.

Tabla 13. Límite de cuantificación

Muestra	Altura del pico en plasma	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)
1	14558	0.1063
2	12904	0.0951
3	13118	0.0965
4	12520	0.0925
5	12413	0.0918
Promedio	13103	0.0964
D.E.	862.10	0.01
C.V (%)	6.6	6.1
Desviación absoluta (%)		3.6

Se analizó por quintuplicado la concentración $0.10 \mu\text{g/mL}$ que corresponde a la más pequeña del intervalo de trabajo y se determinó un coeficiente de variación de 6.1% así como una desviación absoluta de 3.6%.

El coeficiente de variación obtenido es menor a 20% y la desviación absoluta indica que el valor promedio se encuentra dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal.

Por lo tanto se considera a la concentración $0.10 \mu\text{g/mL}$ como el límite de cuantificación del método analítico ya que esta puede ser cuantificada con suficiente exactitud y precisión bajo las condiciones normales de trabajo.

4.3.6. Límite de detección

Se determinó que el límite de detección del método corresponde a la concentración $0.05 \mu\text{g/mL}$, ya que esta presenta una señal de tres veces mayor a la del ruido y puede ser detectada pero no cuantificada.

4.3.7. Estabilidad de la muestra analítica

4.3.7.1 Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente durante 24 horas

En la tabla 14 se presentan los resultados de la evaluación de estabilidad en muestras procesadas de aciclovir mantenidas a temperatura ambiente durante 24 horas. El análisis se llevó a cabo al tiempo cero, 8, 16 y 24 horas después de la preparación de las muestras.

Tabla 14. Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente durante 24 horas

Tiempo 0 horas			
	Bajo	Medio	Alto
	0.20 µg/mL	0.75 µg/mL	1.80 µg/mL
	0.2009	0.7383	1.7915
	0.1959	0.7492	1.823
Promedio	0.1984	0.7437	1.8072
Desviación absoluta (%)	0.8	0.8	0.4
Tiempo 8 horas			
	Bajo	Medio	Alto
	0.20 µg/mL	0.75 µg/mL	1.80 µg/mL
	0.2075	0.7615	1.9236
	0.1993	0.7862	1.8869
Promedio	0.2034	0.7739	1.9052
Desviación absoluta (%)	1.7	3.2	5.8
Tiempo 16 horas			
	Bajo	Medio	Alto
	0.20 µg/mL	0.75 µg/mL	1.80 µg/mL
	0.1844	0.7017	1.6968
	0.1847	0.6964	1.7008
Promedio	0.1846	0.6990	1.6988
Desviación absoluta (%)	7.7	6.8	5.6
Tiempo 24 horas			
	Bajo	Medio	Alto
	0.20 µg/mL	0.75 µg/mL	1.80 µg/mL
	0.1752	0.6939	1.5753
	0.1793	0.6734	1.6361
Promedio	0.1773	0.6837	1.6057
Desviación absoluta (%)	11.4	8.8	10.8

Como se puede observar en la tabla, la concentración de aciclovir en muestras procesadas a tres niveles de concentración disminuye conforme pasa el tiempo y la desviación absoluta aumenta porque el valor de la concentración promedio se aleja cada vez más del valor nominal. Sin embargo, el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta de las réplicas en cada nivel no rebasa el 15% con respecto a la concentración inicial, lo que indica que el aciclovir

es estable en muestras plasmáticas procesadas y mantenidas a temperatura ambiente durante 24 horas después de su preparación.

4.3.7.2. Estabilidad de la muestra almacenada durante 1 mes a -20°C

A continuación se presentan los resultados de estabilidad de las muestras almacenadas de aciclovir durante 1 mes a -20°C . Las réplicas fueron analizadas al tiempo cero, 10, 20 y 30 días después de su preparación.

Tabla 15. Estabilidad de aciclovir en muestras plasmáticas almacenadas durante 1 mes a -20 °C

Día 0			
	Bajo	Medio	Alto
	0.20 µg/mL	0.75 µg/mL	1.80 µg/mL
	0.1999	0.7063	1.6767
	0.2166	0.7163	1.6938
Promedio	0.2082	0.7113	1.6853
Desviación absoluta (%)	4.1	5.2	6.4
Día 10			
	Bajo	Medio	Alto
	0.20 µg/mL	0.75 µg/mL	1.80 µg/mL
	0.2100	0.7935	1.8494
	0.2105	0.7813	1.8972
Promedio	0.2103	0.7874	1.8733
Desviación absoluta (%)	5.1	5.0	4.1
Día 20			
	Bajo	Medio	Alto
	0.20 µg/mL	0.75 µg/mL	1.80 µg/mL
	0.2237	0.8032	1.9566
	0.2152	0.799	1.9965
Promedio	0.2194	0.8011	1.9766
Desviación absoluta (%)	9.7	6.8	9.8
Día 30			
	Bajo	Medio	Alto
	0.20 µg/mL	0.75 µg/mL	1.80 µg/mL
	0.2192	0.7653	1.855
	0.2208	0.7594	1.8392
Promedio	0.2200	0.7623	1.8471
Desviación absoluta (%)	10.0	1.6	2.6

Los resultados de la tabla muestran que el aciclovir es estable en muestras plasmáticas mantenidas en congelación a -20 °C durante 1 mes ya que los coeficientes de variación de los controles analizados se encuentran entre 3.5% y 6.1% y el porcentaje de desviación absoluta con respecto a la concentración nominal entre 2.1% y 7.2%, es decir, inferiores a 15%.

4.3.8. Selectividad del método analítico

Se añadieron diferentes fármacos a muestras plasmáticas y se procesaron de acuerdo al procedimiento descrito en Figura 3. En la tabla 16 se muestran los resultados.

Tabla 16. Selectividad del método analítico

Fármaco	Concentración	Tiempo de retención	Área del pico	Altura del Pico
Aciclovir	2.0 µg/mL	4.6	2267645	218460
Cafeína	20 µg/mL	0	0	0
Naproxen Sódico	50 µg/mL	0	0	0
	100 µg/mL	0	0	0
Paracetamol	20 µg/mL	0	0	0

No se observan señales de plasma ni de fármacos como Cafeína, Naproxen Sódico y Paracetamol que interfieran con la respuesta cromatográfica del aciclovir.

El método se considera específico para la cuantificación de aciclovir ya que no se reportan señales de plasma y fármacos de uso común en el mismo tiempo de retención del compuesto de interés.

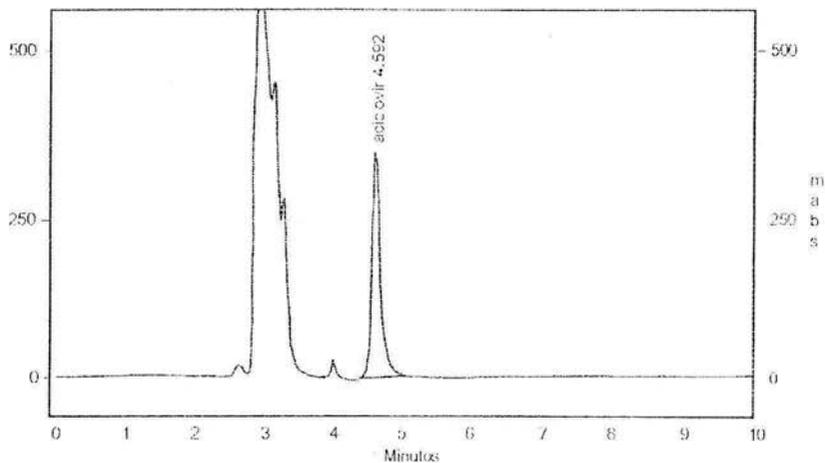


Figura 6. Solución conteniendo Aciclovir (2.0 µg/mL)

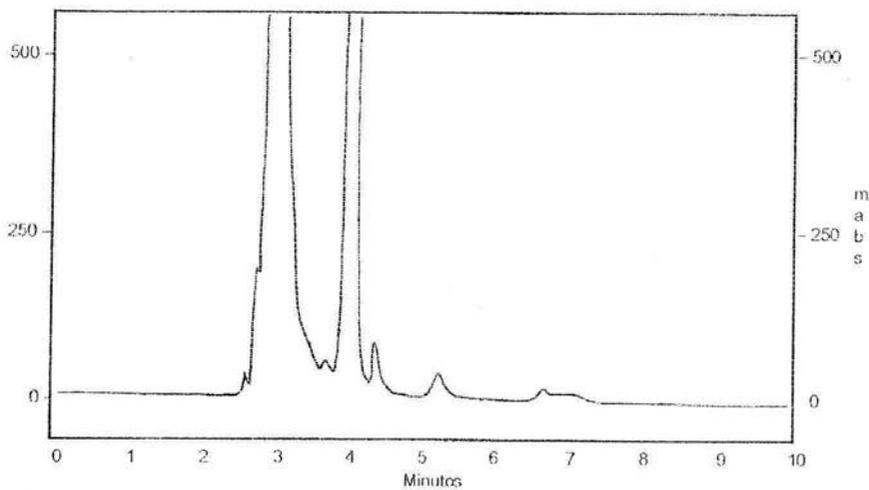


Figura 7. Muestra blanco de plasma

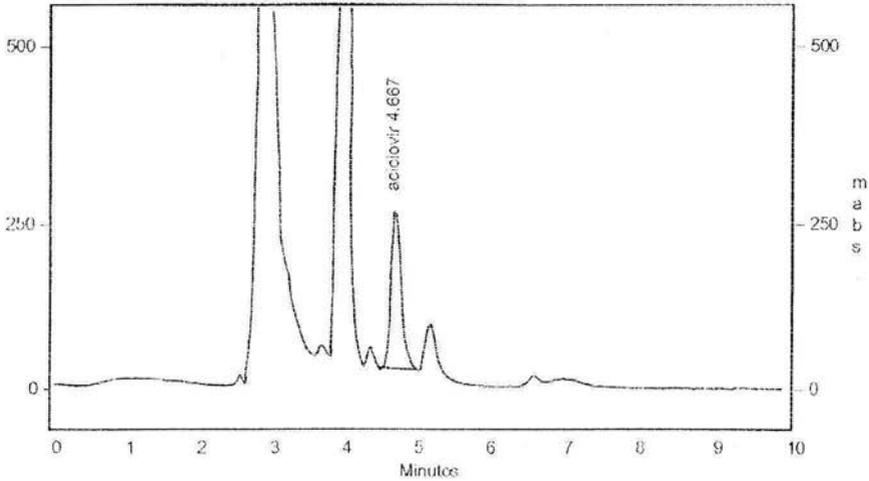


Figura 8. Plasma adicionado con Aciclovir (2.0 µg/mL)

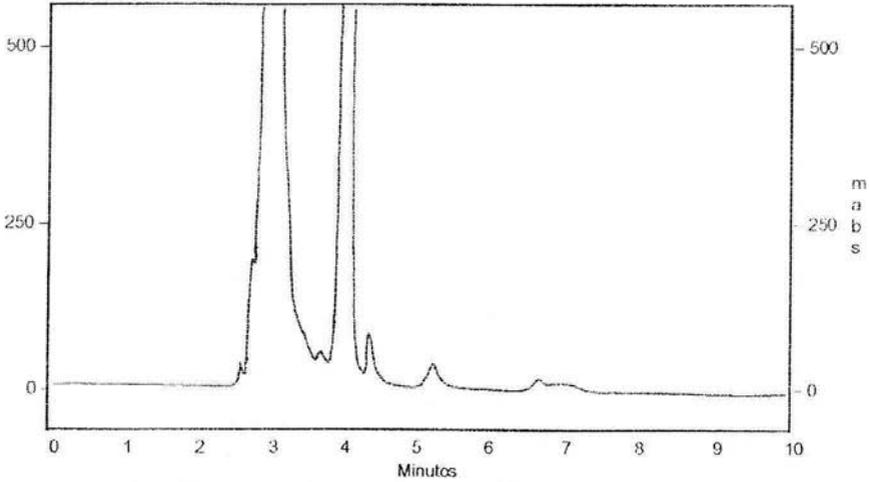


Figura 9. Plasma adicionado con Cafeína (20 µg/mL)

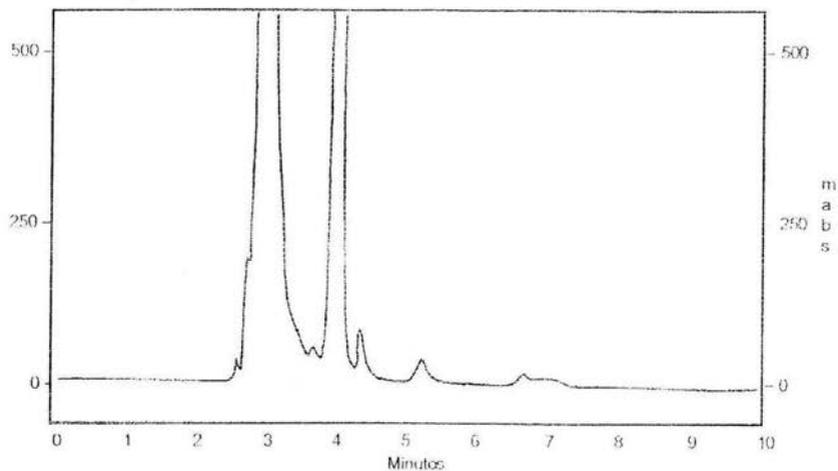


Figura 10. Plasma adicionado con Naproxen Sódico (50 µg/mL)

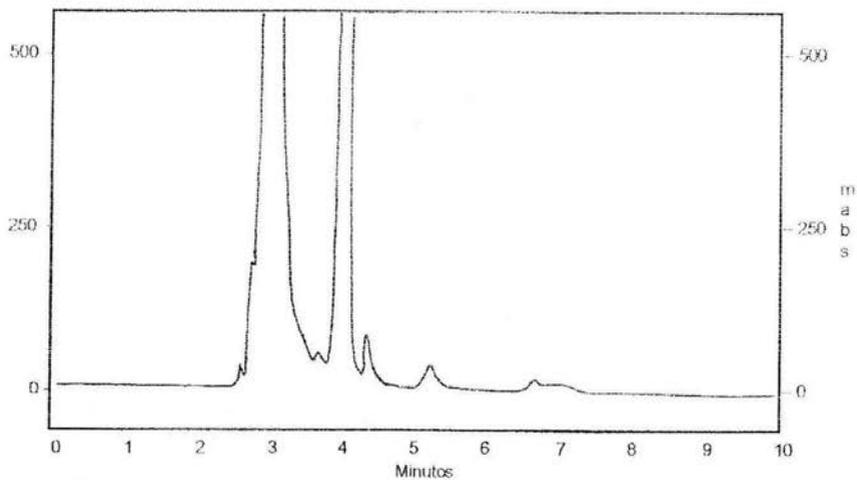


Figura 11. Plasma adicionado con Naproxen Sódico (100 µg/mL)

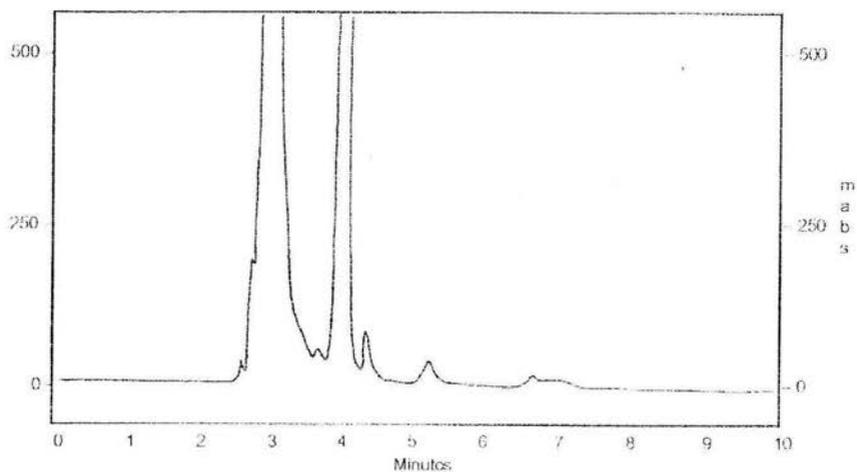


Figura 12. Plasma adicionado con Paracetamol (20 $\mu\text{g/mL}$)

Capítulo V. Conclusiones

El método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta resolución para cuantificar aciclovir en plasma se considera:

- Lineal dentro del intervalo de concentraciones de 0.1 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$.
- Preciso ya que al analizar por quintuplicado muestras a tres diferentes niveles de concentración, se obtuvieron coeficientes de variación menores a 15%.
- Exacto porque el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración durante tres diferentes días de análisis, estuvieron dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.
- Sensible ya que la concentración mínima que puede ser cuantificada con suficiente exactitud y precisión es 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y el límite de detección es 0.05 $\mu\text{g/mL}$.
- Selectivo y específico para aciclovir ya que en la respuesta cromatográfica no interfieren sustancias endógenas presentes en la matriz biológica ni

Conclusiones

tampoco fármacos de uso frecuente como Cafeína, Naproxen Sódico y Paracetamol.

- Estable porque las muestras procesadas y mantenidas durante 24 horas a temperatura ambiente, presentan coeficientes de variación y porcentajes de desviación absoluta para cada nivel de concentración menores a 15%.
- Estables también son las muestras almacenadas durante 1 mes a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ya que el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta respecto a la concentración nominal en los tres niveles no rebasan el 15%.
- Rápido de realizar ya que la técnica analítica permite un rápido procesamiento de las muestras, alto porcentaje de recobro y tiempos cortos de análisis.

Finalmente, se considera que el método analítico para cuantificar aciclovir en plasma cuenta con un procedimiento de extracción del fármaco sencillo y económico, lo que permitiría el análisis de una gran cantidad de muestras durante un estudio de bioequivalencia, de biodisponibilidad o de farmacocinética.

Capítulo VI. Bibliografía

- 1.- Requiere México de una política para fijar los precios de los medicamentos. Periódico La Jornada. Domingo 4 de mayo de 2003. México, D.F. Sociedad y Justicia p.34. Año 19. Número 6710.
- 2.- Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Diario Oficial de la Federación, primera sección, viernes 7 de Mayo de 1999.
- 3.- F.J. Flores, G. Castañeda, R. Medina. Biodisponibilidad y Bioequivalencia en los medicamentos genéricos. Editorial Asclepius. México, 2002. pp. 5, 16, 19, 39-43.
- 4.- Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica Vol 2. Octava Edición en Español. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. España, 1996. pp. 1269-1270.
- 5.- Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos. Consejo de Salubridad General. 15 de Noviembre de 1996.
- 6.- <http://www.salud.gob.mx>. Listado integrado y por orden alfabético, actualizado al 13 de Agosto del 2004, del catálogo de medicamentos genéricos intercambiables.
- 7.- Norma Oficial Mexicana. Acuerdo por el que se relacionan las especialidades Farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos

Bibliografía

Genéricos Intercambiables y se determinan las pruebas que deberán aplicárseles. Diario Oficial de la Federación, 19 de Marzo de 1998.

8.- H. Cárdenas. Aspectos Biofarmacéuticos de la Evaluación de Medicamentos. . 1ª Edición. UAM Campus Xochimilco. México, 1996. pp.19-42, 109-112.

9.- Reglamento de Insumos para la Salud. Diario Oficial de la Federación, Febrero de 1998.

10.- Catálogo de medicamentos genéricos intercambiables. Diario Oficial de la Federación, 18 de Agosto de 1998.

11.- The Merck Index. Twelfth Edition. Published by Merck Research Laboratories Division of Merck and Co. INC Whitehouse Station NJ 1996. p. 27.

12.- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Edición 48. Ediciones PLM, S.A. de C.V. México, 2002. pp. 8, 451-452, 826, 1263, 1693-1694, 1704, 2588-2589, 2600, 2617-2620.

13.- The United States Pharmacopoeia & National Formulary. Twenty Four Edition. pp. 46-47.

14.- European Pharmacopoeia. Third Edition. Published in accordance with the convention on the elaboration of a European Pharmacopoeia. Council of Europe Strasbourg, 1996. pp. 346-347.

15.- Martindale. The Extra Pharmacopoeia. Thirty-First Edition. Edited by James E.F. Reynolds. Royal Pharmaceutical Society, London, 1996. pp. 642-645.

16.- A. Loregian, R. Gatti, G. Palú, E.F. De Palo. Separation methods for Acyclovir and related antiviral compounds, J. Chromatogr. B 764 (2001) 289-311.

Bibliografía

- 17.- R.P. Quinn, P. de Miranda, L. Gerald, S. Good. A sensitive Radioimmunoassay for the Antiviral Agent Bw248U [9-(Hydroxyethoxymethyl)Guanine], *Anal. Biochem.* 98 (1979) 319-328.
- 18.- S.M. Tadepalli, R.P. Quinn. Scintillation proximity radioimmunoassay for the measurement of Acyclovir, *J. Pharma. Biomed. Appl.* 15 (1996) 157-163.
- 19.- D.F. Moore, S.C. Taylor, Y.J. Bryson. Virus inhibition assay for measurement of Acyclovir levels in human plasma and urine, *Antimicrob. Agents Chemother.* 20 (1981) 787-792.
- 20.- S.M. Tadepalli, R.P. Quinn, D.R. Averett. A competitive Enzyme-Linked Immunosorbent assay to quantitate Acyclovir and BW B759U in human plasma and urine, *Antimicrob. Agents Chemother.* 29 (1986) 93-98.
- 21.- G. Land, A. Bye. Simple high-performance liquid chromatographic method for the analysis of 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine (acyclovir) in human plasma and urine, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 224 (1981) 51-58.
- 22.- R.L. Smith, D.D. Walker. High-performance liquid chromatographic determination of acyclovir in serum, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 343 (1985) 203-207.
- 23.- J.-P. Sommadossi, R. Bevan. High-performance liquid chromatographic method for the determination of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine in human plasma, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 414 (1987) 429-433.
- 24.- H. Mascher, C. Kikuta, R. Metz, H. Vergin. New, high-sensitivity high-performance liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in

human plasma, using fluorometric detection, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 583 (1992) 122-127.

25.- P. Nebinger, M. Koel. Determination of acyclovir by ultrafiltration and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 619 (1993) 342-344.

26.- K.J. Swart, H.K.L. Hundt, A.M. Groenewald. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in plasma, *J. Chromatogr. A* 663 (1994) 65-69.

27.- N.M. Volpato, P. Santi, C. Laureri, P. Colombo. Assay of acyclovir skin layers by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16 (1997) 515-520.

28.- J.O. Svensson, L. Barkholt, J. Sawe. Determination of acyclovir and its metabolite 9-carboxymethoxymethylguanine in serum and urine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 690 (1997) 363-366.

29.- R. Boulieu, C. Gallant, N. Silberstein. Determination of acyclovir in human plasma by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 693 (1997) 233-236.

30.- K.K. Peh, K.H. Yuen. Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in human plasma using fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 693 (1997) 241-244.

- 31.-** A. Jankowski, A.L. Jankowska, H. Lamparczyk. Determination and pharmacokinetics of acyclovir after ingestion of suspension form, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 249-254.
- 32.-** C. Pham-Huy, F. Stathoulopoulou, P. Sandouk, J.M. Sherrmann, S. Palombo, C. Girre. Rapid determination of valanciclovir and acyclovir in human biological fluids by high-performance liquid chromatography using isocratic elution, *J. Chromatogr. B* 732 (1999) 47-53.
- 33.-** R.A. Bangaru, Y.K. Bansal, A.R.M. Rao, T.P. Ghandi. Rapid, simple and sensitive high-performance liquid chromatographic method for detection and determination of acyclovir in human plasma and its use in bioavailability studies, *J. Chromatogr. B* 739 (2000) 231-237.
- 34.-** M. Fernández, J. Sepúlveda, T. Aránguiz, C. Von Plessing. Technique validation by liquid chromatography for the determination of acyclovir in plasma, *J. Chromatogr. B* 791 (2003) 357-363.
- 35.-** V.P. Shah, K.K. Midha, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, A. Yacobi. Bioanalytical Method Validation-A Revist with a Decade of Progress, *Pharm. Res.* 17(12) (2000) 1551-1557.
- 36.-** Validation of analytical procedures: methodology, Tripartite International Conference on Harmonisation (ICH) Text, ICH Tech. Coordination. London, 6 November 1996.
- 37.-** Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug
-

Bibliografía

Evaluation and Research (CDER), Center for veterinary Medicine (CVM). May 2001.

38.- Ph, Hubert, P. Chiap, J. Crommen, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Mercier, S. Bervoas-Martin, P. Chevalier, D. Grandjean, P. Lagorce, M. Lallier, M.C. Laparra, M. Laurentie, J.C. Nivet. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory, Ana. Chim. Act. 391 (1999) 135-148.

39.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Tomo 2. 7^a Edición. México, 2000. pp. 1744-1745.